

# Biociência Animal

---

Alécio Matos Pereira  
Tairon Pannunzio Dias e Silva  
Sara Silva Reis  
(Organizadores)



# Biociência Animal

---

Alécio Matos Pereira  
Tairon Pannunzio Dias e Silva  
Sara Silva Reis  
(Organizadores)



2019 by Atena Editora  
Copyright © Atena Editora  
Copyright do Texto © 2019 Os Autores  
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora  
Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira  
Diagramação: Natália Sandrini  
Edição de Arte: Lorena Prestes  
Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima  
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia  
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

### Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí  
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
B615	Biociência animal [recurso eletrônico] / Organizadores Alécio Matos Pereira, Tairon Pannunzio Dias e Silva, Sara Silva Reis. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.  Formato: PDF Requisitos de sistemas: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-785-7 DOI 10.22533/at.ed.857192811  1. Biociência. 2. Zoologia. I. Pereira, Alécio Matos. II. Silva, Tairon Pannunzio Dias e. III. Reis, Sara Silva.  CDD 590
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br

## APRESENTAÇÃO

O livro de “Biociência Animal” une várias abordagens da utilização do animal para desenvolver o bem-estar humano, ciência animal e segurança alimentar. É um livro versátil que tem 7 capítulos e vários colaboradores especializados na área da ciência animal.

São abordados em seus capítulos assuntos como equoterapia, métodos alternativos para conservação de peças anatômicas, ação da melatonina e do estrógeno sobre o crescimento do tumor e métodos de avaliação da qualidade de carne moída além de outros temas.

A equoterapia, é um método terapêutico que utiliza o cavalo dentro de uma abordagem interdisciplinar nas áreas de saúde, educação e equitação, buscando o desenvolvimento biopsicossocial de pessoas com deficiência e/ou com necessidades especiais alcançando excelentes resultados no desenvolvimento da psicomotricidade e inclusão de jovens com necessidades especiais.

A busca por alternativas ao formol é fundamental para diminuir o seu uso, visto que é uma substância tóxica para o ser humano. Um olhar sobre alternativas para entender o processo mitótico que leva o crescimento dos tumores faz desse capítulo uma fonte para verificar a influência da melatonina e estrógeno no crescimento desse tumor.

O crescimento populacional e a necessidade por alimentos que atendam a crescente demanda, imprime o uso de alternativas alimentares na produção animal. Nesse contexto, o estudo do uso da silagem de grão úmido de milho na alimentação de bovinos de corte torna-se assunto fundamental para o avanço da capacidade produtiva dos animais e rentabilidade do setor, principalmente nos confinamentos.

Um país de mais de 210 milhões de habitantes, com uma demanda crescente por produtos de origem animal, requer um olhar preciso sobre os caminhos da produção dos produtos de origem animal. O capítulo métodos de avaliação da qualidade de carne moída lança um olhar a microbiologia e aos aspectos físico-químicos desse produto tão utilizado na cozinha brasileira

Este livro é destinado a promover fonte de ensino para os estudantes da ciência animal, apresentando uma abordagem eficiente sobre temas relevantes nessa área e enriquecendo em conhecimentos os que minuciosamente estudarem seus capítulos.

Alécio Matos Pereira  
Tairon Pannunzio Dias e Silva  
Sara Silva Reis

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
“UM NOVO OLHAR SOBRE QUATRO PATAS: EQUOTERAPIA”	
Jullyana de Souza Silva	
Amanda Melo Sant'anna Araújo	
Eric Francelino Andrade	
Débora Ribeiro Orlando	
Tânia Pires da Silva	
Claudinete da Assunção Ramos Penha	
Camila Fernandes Oliveira	
Bruna Maria Braga Teixeira	
Igor Vitor Alcântara Calmon	
Karolline Aires da Costa	
Lun Miranda Sales	
Karielly Amaral Andrade	
<b>DOI 10.22533/at.ed.8571928111</b>	
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>10</b>
AÇÃO DA MELATONINA E DO ESTRÓGENO SOBRE O CRESCIMENTO DO TUMOR DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS SWISS	
Danielle Dutra Pereira	
Wanessa Noadya Ketry de Oliveira	
Priscila Maria do Santos Oliveira	
Laíse de Souza Elias	
Jeine Emanuele Santos da Silva	
Thaís Heloise da Silva Almeida	
George Chaves Jimenez	
Joaquim Evêncio Neto	
<b>DOI 10.22533/at.ed.8571928112</b>	
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>23</b>
AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA CONSERVAÇÃO DE PEÇAS ANATÔMICAS E SUAS APLICAÇÕES CONSCIENTES NO LABORATÓRIO DE ANATOMIA ANIMAL	
Mariana Biscaro Zófoli	
Jorge Gonçalves Pires	
Camila Ramos De Oliveira Nunes	
Ana Bárbara Freitas Rodrigues	
Stefany Martins De Almeida	
Gina Nunes Teixeira	
Leonardo Siqueira Glória	
Raphael Weller Ferreira Menassa	
<b>DOI 10.22533/at.ed.8571928113</b>	
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>39</b>
CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS DE CODORNAS JAPONESAS EM POSTURA SUPLEMENTADAS COM 1,25-DIHIIDROXIVITAMINA-D <sub>3</sub> -GLICOSÍDEO DE ORIGEM VEGETAL	
Christiane Silva Souza	
Maria Goreti de Almeida Oliveira	
Sérgio Luiz de Toledo Barreto	
Flávio Medeiros Vieites	
Arele Arlindo Calderano	
<b>DOI 10.22533/at.ed.8571928114</b>	

<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>51</b>
IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA RAÇA GIROLANDO NO ESTADO DO AMAZONAS	
Léo Fernando de Faria Salgado	
<b>DOI 10.22533/at.ed.8571928115</b>	
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>61</b>
MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE CARNE MOÍDA	
Maria Santos Oliveira	
Felicianna Clara Fonsêca Machado	
Gladiane dos Santos Nunes	
Cristiano Pinto de Oliveira	
Natylane Eufransino Freitas	
Helga Germana de Sousa Ribeiro	
Juanna D'arc Fonsêca dos Santos	
Laíze Falcão de Almeida	
Vanusa Castro de Sousa	
Samara de Castro Sousa	
Larissa Maria Feitosa Gonçalves	
Antonio Augusto Nascimento Machado Júnior	
<b>DOI 10.22533/at.ed.8571928116</b>	
<b>CAPÍTULO 7 .....</b>	<b>83</b>
USO DE SILAGEM DE GRÃO ÚMIDO DE MILHO NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE	
Kárito Augusto Pereira	
Renata Vaz Ribeiro	
Otávio Augusto Martins Oliveira	
Thais Marques Santana	
Alliny das Graças Amaral	
Natalia de Avila Soares	
Mariane Rodrigues Ferreira	
<b>DOI 10.22533/at.ed.8571928117</b>	
<b>SOBRE OS ORGANIZADORES.....</b>	<b>94</b>
<b>ÍNDICE REMISSÍVO .....</b>	<b>95</b>

## “UM NOVO OLHAR SOBRE QUATRO PATAS: EQUOTERAPIA”

**Jullyana de Souza Silva**  
**Amanda Melo Sant'anna Araújo**  
**Eric Francelino Andrade**  
**Débora Ribeiro Orlando**  
**Tânia Pires da Silva**  
**Claudinete da Assunção Ramos Penha**  
**Camila Fernandes Oliveira**  
**Bruna Maria Braga Teixeira**  
**Igor Vitor Alcântara Calmon**  
**Karolline Aires da Costa**  
**Lun Miranda Sales**  
**Karielly Amaral Andrade**

**RESUMO:** A Equoterapia, conforme a Associação Nacional de Equoterapia (ANDE-Brasil), é um método terapêutico que utiliza o cavalo dentro de uma abordagem interdisciplinar nas áreas de saúde, educação e equitação, buscando o desenvolvimento biopsicossocial de pessoas com deficiência e/ou com necessidades especiais. Essa terapia é um importante instrumento utilizado por profissionais da saúde e educação para alcançarem objetivos terapêuticos e educacionais. Com a intenção de levar a Equoterapia a um número maior de pessoas, estudantes, técnicos administrativos e professores do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), se propuseram a otimizar

o trabalho já existente no município de Unaí, criado pela Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE-Unaí). A Equoterapia na APAE- Unaí teve início em 2007, em uma chácara localizada num bairro afastado da cidade, o que dificultava o acesso de muitos praticantes. Em 2017, após um longo período de busca por doações, realização de eventos para aquisição dos materiais necessários para a execução do projeto, capacitação junto à ANDE-Brasil, orientação dos envolvidos quanto ao cuidado animal, o projeto, em parceria com a APAE-Unaí, foi implantado no Instituto de Ciências Agrárias da UFVJM em Unaí. Permitindo o acesso de mais praticantes.

**PALAVRAS-CHAVE:** terapia, desenvolvimento biopsicossocial, interdisciplinar

### “A NEW LOOK ON FOUR LEGS: EQUINE THERAPY”

**ABSTRACT:** Equotherapy, according to the National Association of Equine Therapy (ANDE-Brazil), is a therapeutic method that uses the horse within an interdisciplinary approach in the areas of health, education and riding, seeking the biopsychosocial development of people with disabilities and / or needs special. This therapy is an important tool to be used by health

and education professionals to achieve therapeutic and educational goals. With the intention of bringing the Therapy to a greater number of people, students, administrative technicians and professors of the Institute of Agrarian Sciences of the Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys (UFVJM), proposed to optimize the existing Equine Therapy work in the municipality of Unaí, created by the Association of Parents and Friends of the Exceptional (APAE-Unaí). Equine therapy at APAE-Unaí began in 2007, in a farm located in a neighborhood away from the city, which made it difficult for many patients to access. In 2017, after a long period of fundraising, the search for donations, the realization of events to acquire the necessary materials for the execution of the project, training of staff with ANDE-Brasil, orientation of those involved in animal care, in partnership with APAE-Unaí, was implemented at the Institute of Agricultural Sciences of UFVJM in Unaí. This allowed the access of more practitioners.

**KEYWORDS:** therapy, biopsychosocial development, interdisciplinary

## INTRODUÇÃO

A Equoterapia é um método terapêutico e educacional que utiliza o cavalo dentro de uma abordagem interdisciplinar nas áreas de saúde, educação e equitação, buscando o desenvolvimento biopsicossocial de pessoas portadoras de deficiência e/ou com necessidades especiais (ANDE-Brasil, 2017). Atualmente, a Equoterapia é considerada uma técnica de auxílio à terapia convencional e é praticada em mais de trinta países, tendo sido reconhecida cientificamente pelo Conselho Federal de Medicina (CFM), em Sessão Plenária de 09 de abril de 1997 (ANDE-Brasil, 2017).

O cavalo é empregado como agente promotor de ganhos a nível físico e psíquico, uma vez que a utilização do cavalo, como instrumento terapêutico proporciona um movimento que é tridimensional, variável, rítmico e repetitivo. Esta atividade exige a participação do corpo inteiro, contribuindo, assim, para o desenvolvimento da força muscular, relaxamento, conscientização do próprio corpo e aperfeiçoamento da coordenação motora e do equilíbrio (CALAIS-GERMAIN, 1991).

Não existe uma raça de cavalos específica para ser usado na equoterapia. O importante é que o animal possua os três andamentos regulares: passo, trote e galope, sendo o passo a andadura mais utilizada na equoterapia. Ao passo o cavalo realiza um movimento tridimensional exatamente idêntico ao andar do ser humano (ALVES, 2009). E por ter exatamente esse tipo de movimento, só ele é capaz de proporcionar uma reabilitação das pessoas com necessidades especiais. Segundo Rêgo (1999), ao deslocar-se durante o passo, o cavalo produz movimentos em seu dorso que são transmitidos ao cavaleiro ocorrendo deslocamentos contínuos, tridimensionalmente, esse movimento é caracterizado por movimentos para cima e para baixo no plano vertical; para a direita e para a esquerda no plano horizontal,

segundo o eixo transversal do cavalo e para frente e para trás segundo o seu eixo longitudinal.

No decorrer do passo, o cavalo desloca o pescoço para baixo e para cima. A base do pescoço, onde se apoia a sela, descreve um movimento de baixo para cima, movendo-se alternadamente à esquerda, quando o cavalo descansa o membro anterior esquerdo, e à direita, quando o faz com o membro anterior direito. Sendo assim, o praticante sofre três forças distintas sobre o cavalo: denominada de movimento tridimensional, proporciona ao praticante uma adaptação ao ritmo do passo do cavalo, exigindo contração e descontração simultâneas dos músculos agonistas e antagonistas, determinando um ajuste tônico da musculatura para manutenção da postura e do equilíbrio (Lermontov, 2004). A ação cinética e dinâmica realizada pelo cavalo exige do praticante movimentos de antecipação, orientação e adaptação que envolvem o sistema nervoso a nível neuromotor e neuropsíquico, sendo a equoterapia considerada um conjunto de técnicas de reeducação e reabilitativas que atuam para superar danos sensoriais e motores, cognitivos e comportamentais (SENATOR, 1939). Os praticantes com necessidades especiais encontram nessa prática a possibilidade de desenvolverem o equilíbrio, a coordenação e o aprimoramento da força muscular, além da satisfação que o ato de cavalgar propicia no praticante em virtude da interação com o animal. A equoterapia também pode usar o cavalo para o desenvolvimento pedagógico, em praticantes que contam com alguma autonomia, a fim de lhes valorizar a autosegurança.

Entre os efeitos terapêuticos que podem ser alcançados com a prática, podemos citar:

- Melhoramento da relação com a valorização plena do indivíduo a cavalo (comunicação, autocontrole, autoconfiança, atenção);

- Melhoramento da psicomotricidade com a melhora do tônus (mobilização das articulações da coluna e do quadril, facilitando o equilíbrio e da postura do tronco ereto, favorecimento da obtenção de lateralidade, melhora da percepção do esquema corporal);

- Favorece a referência de espaço e de tempo, permite que se trabalhe a coordenação e dissociação de movimentos, facilita a precisão do gesto, permite melhor conhecimento de posições de seu corpo e do corpo do cavalo, permite a integração do gesto para compreensão de uma ordem recebida ou por imitação);

- Melhoramento de natureza técnica (facilitando as aprendizagens de cuidados com os cavalos, facilitando o aprendizado das técnicas de equitação, como condução do animal em várias velocidades, manejo e até pequenos saltos, para alguns praticantes); e melhoramento da socialização (integração de indivíduos com danos cognitivos ou corporais com os demais praticantes e com a equipe multidisciplinar).

Conforme Spink (1993), o animal atua não apenas como um espelho, onde são

projetadas as dificuldades, progressos e vitórias, mas também como um novo estímulo que propicia novas percepções e vivências, atribuição de novos significados. Por meio da relação com o cavalo, a criança pode aprender a controlar suas emoções iniciais, como o medo, enfrentando o desafio de montá-lo e, sentada numa posição superior, direcioná-lo. Cavalgar um animal dócil, porém de porte avantajado, leva o praticante a experimentar sentimentos de liberdade, independência e capacidade: sentimentos esses importantes para a aquisição da autoconfiança, realização e autoestima. Portanto, a interação com o cavalo, incluindo os primeiros contatos, os cuidados preliminares, o ato de montar e o manuseio final desenvolvem, ainda, novas formas de socialização, autoconfiança e autoestima (PIEROBON, 2011).

O projeto tinha por objetivo ampliar o número de pessoas atendidas por esta terapia que proporciona através do cavalo, melhores condições de vida aos praticantes com necessidades especiais em tratamento na APAE- Unaí, auxiliando no desenvolvimento de suas potencialidades, respeitando seus limites e visando sua integração na sociedade, determinando benefícios físicos, psicológicos, educativos e sociais, em muitos casos tornando-os cada vez mais independentes em suas atividades de vida diária. Além de integrar nossos discentes, técnicos e docentes do Campus Unaí em atividades técnico-social permitindo seu desenvolvimento acadêmico e seu desenvolvimento como cidadão de bem, promovendo a interação da comunidade universitária com a comunidade externa, reduzindo seus problemas e dificuldades num intercâmbio de conhecimentos, saberes e experiências. Permitindo aos nossos discentes exercer a cidadania plena com responsabilidade e inclusão social.

## MÉTODOS

O projeto conta com um bolsista e 15 discentes voluntários, três docentes e dois técnicos administrativo da UFVJM, que atuam no manejo sanitário e nutricional dos equinos, além de auxiliarem nos dias de terapia preparando e conduzindo os cavalos e um fisioterapeuta, terapeutas ocupacionais, psicólogos e neurologista da APAE, que selecionavam e instituíam a terapia aos praticantes de equoterapia.

Contávamos com três equídeos para a terapia. Os animais precisavam ter temperamento adequadamente dócil, não podendo se assustar com facilidade. Além de apresentarem o andamento marchado. Foi avaliado a sanidade e elaborado uma dieta adequada ao tipo de trabalho. Estes animais foram acompanhados por Médicos Veterinário e Zootecnistas de forma a otimizar seu trabalho. Porém após as avaliações de temperamento e estrutura foi verificado que apenas um animal era adequado a desempenhar o trabalho proposto.

A rampa para montaria de praticantes com necessidades especiais e a pista de terapia foi construída no campus provisório da UFVJM, o que facilitou o acesso para tratamento dos praticantes, uma vez que o transporte adaptado era muito limitado, e como o Campus está localizado ao lado das instalações da APAE facilitou o trabalho dos técnicos. O cavalo era trazido ao campus nos dias de tratamento e após a terapia retornava ao local de origem. Com esse processo estava deixando o cavalo muito cansado, construímos um alojamento para ele (figura 01).

Alguns membros da equipe do projeto participaram de cursos de capacitação junto a ANDE – Brasil (Associação Nacional de Equoterapia), para adquirir e aprimorar os conhecimentos sobre o assunto e desta forma desenvolver um melhor trabalho.

Foram elaborados trabalhos relativos a comportamento e bem-estar animal e outros para avaliação das pastagens mais adequadas a alimentação dos cavalos destinados ao trabalho de equoterapia.

Era feito diversas atividades (didáticas, psicomotoras e aproximação) para inteiração entre cavalo e praticante (figuras 02, 03, 04), foi elaborado instrumentos individuais, que pudessem facilitar e dar mais segurança a alguns praticantes (figura 05), foi feito prontuários, para que pudéssemos transcrever a evolução de cada praticante, atividades realizadas, limitações, local de origem e tempo de tratamento.

O estudante de graduação, sempre monitorado por um profissional, ajudava na aferição do estado de saúde, manutenção e cuidados adequados a este cavalo, profissional este, familiarizado com a rotina de manejo com cavalos.

Para um melhor inserção do aluno nas sessões de equoterapia, fizeram cursos de capacitação, o que era imprescindível para proporcionar maior segurança aos praticantes e um importante apoio a equipe multidisciplinar. Os estudantes participaram de aulas e palestras, as quais abordavam temas de equinocultura e equoterapia para um melhor empenho nos cuidados e manejo com os cavalos.

## RESULTADOS

A APAE de Unaí, como entidade filantrópica atendia com a equoterapia cerca de 10 praticantes mensalmente, de uma demanda semanal de 30 praticantes candidatos a esta terapia. Em 2016 o projeto registrado sob o número 100.2.155.2016 na PROEX da UFVJM, foi implantado no Campus provisório da UFVJM em Unaí, apesar de possuírem um rancho, que fica a 15 Km da cidade, havia um problema para organizar a logística de transporte destes praticantes que possuíam necessidades especiais, ao local que era executada a terapia, determinando muitas faltas conseqüentemente descontinuidade da terapia. Com a implantação da pista

de equoterapia nas instalações da UFVJM, conseguimos reduzir drasticamente as faltas mantendo uma frequência de tratamento maior, pois as instalações atuais ficam a 50m do portão da APAE-Unaí. O número de praticantes tratados passou de 5/semana para 20/semana. Tornando a manutenção do projeto bastante relevante para os praticantes da APAE. E reduzindo a fila que se formava para aguardar vaga nesta terapia.

Os discente da UFVJM integraram-se à equipe de profissionais da APAE, os quais cuidavam da saúde do praticantes com necessidades especiais. Essa integração permitiu que o discente desenvolvesse espírito de equipe e com isso ajudou na preparação para enfrentar muitas situações na qual ele seja solicitado posteriormente em sua vida profissional. O contato do estudante com o animal e os praticantes contribuiu para uma sólida formação pessoal e emocional, estimulando-o a pensar no próximo e na humanidade com parte de si mesmo.

## CONCLUSÕES

A implantação da equoterapia ajuda na melhora da qualidade de vida e inclusão social dos praticantes com necessidades especiais, a instalação em local de fácil acesso amplia o número de praticantes e contribui para assiduidade e continuidade do tratamento dos pacientes da APAE-Unaí. O trabalho social também capacita os docentes, discentes e técnicos da UFVJM, ajudando na formação de caráter, no desenvolvimento do sentimento de solidariedade e na solidificação do altruísmo.

## FOTOS



Figura 01: Os discentes juntamente com técnicos e docentes construíram a baia e a pista de equoterapia da UFVJM/ICA.



Figura 02: exercício de aproximação e empatia entre praticante e cavalo.



Figura 03: exercícios de desenvolvimento do equilíbrio.



Figura 04: Atividade pedagógica sobre o cavalo – montagem de quebra-cabeça.



Figura 05: instrumentos de adaptação para facilitar a montaria.

## FONTES DE FINANCIAMENTO

O projeto foi implantado com doações da comunidade e UFVJM/Proexc disponibilizou uma bolsa para ajuda de custo um discente, colaborador do projeto

## CONFLITO DE INTERESSES

“Declaramos não ter conflito de interesse”.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Proex-UFVJM por nos apoiar e a APAE-Unaí por nos permitir ajudá-los.

## REFERÊNCIAS

ALVES, E. M. R., **Prática Em Equoterapia – Uma Abordagem Fisioterápica**, São Paulo, SP, Atheneu, 2009.

ANDE – Brasil Site: [www.equoterapia.org.br](http://www.equoterapia.org.br) acessado em: 15 de março de 2017.

CALAIS-GERMAIN, B., Anatomia Para O Movimento, **Volume 1: Introdução à Análise das Técnicas Corporais**; [tradução Sophie Guernet], São Paulo, Manole, 1991.

LERMONTOV, T., A Psicomotricidade Na Equoterapia - Aparecida, SP: **Idéias e Letras**, 2004.

PIEROBON, J. C. Marchizeli, et al, Estímulos Sensório-Motores Proporcionados Ao Praticante De Equoterapia Pelo Cavalo Ao Passo Durante A Montaria, **Revista Ensaios e Ciência**: Vol. XII, nº2, ano 2008.

RÊGO, Jorge Augusto: **Equitação – A Preparação Física Do Cavaleiro**, Rio de Janeiro: Affonso e Reichmann Editores Associados, 1999.

RINK, Bjarke: **Desvendando O Enigma Do Centauro: Como A União Homem-Cavalo Acelerou A História E Transformou O Mundo** – São Paulo: Equus Brasil, 2008.

SENATOR, M., **O Valor Da Equitação Para A Saúde**, Editora Nacional, São Paulo, SP, 1939.

SEVERO, J. T., Equoterapia: Equitação, Saúde E Educação, Editora SENAC, São Paulo, SP, 2010.

SILVEIRA, M. M., Reeducação da Postura Com A Equoterapia, 2008, **Revista Neurociencia**, Disponível em: <<http://www.revistaneurociencias.com.br/inpress/531/20revisao/20inpress/20new.pdf>>, Acessado em: 26/11/2016.

SPINK, J., Developmental riding therapy: a team approach to assessment and treatment. Texas: **Therapy Skill Builders**, 1993.

VETRANO, C.O. Q., Visualização da Semelhança Entre os Movimentos Tridimensionais Do Andar Do Cavalo Com O Andar Humano, 2006, **Ande Brasil, Associação Nacional de Equoterapia**, Disponível em: <<http://www.equoterapia.org.br/trabalho/20082221.pdf>>, Acessado em: 05/09/2017.

WICKERT, H., O cavalo como instrumento cinesioterapêutico, 1995, Brasília - DF – **Ande Brasil, Associação Nacional de Equoterapia**, Trabalhos Técnicos Científicos, Disponível em: <<http://www.equoterapia.org.br/trabalho/11021000.pdf>>, Acessado em: 05/09/2016.

## AÇÃO DA MELATONINA E DO ESTRÓGENO SOBRE O CRESCIMENTO DO TUMOR DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS SWISS

**Danielle Dutra Pereira**

Universidade Federal de Pernambuco  
Recife – PE

**Wanessa Noadya Ketry de Oliveira**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife – PE

**Priscila Maria do Santos Oliveira**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife – PE

**Laíse de Souza Elias**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife – PE

**Jeine Emanuele Santos da Silva**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife – PE

**Thaís Heloise da Silva Almeida**

Universidade Federal de Pernambuco  
Recife – PE

**George Chaves Jimenez**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife – PE

**Joaquim Evêncio Neto**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife – PE

de Ehrlich. Foram utilizados 56 camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*), de 60 dias de idade, divididas em sete grupos experimentais (n = 8 animais/grupo): A- Pinealectomizados tratados com estrógeno e melatonina; B- Sham-pinealectomizados tratados com estrógeno e melatonina; C- Pinealectomizados tratados com estrógeno; D- Sham-pinealectomizados tratados com estrógeno; E- Pinealectomizados tratados com veículo do estrógeno; F- Sham-pinealectomizados tratados com veículo do estrógeno; G- Controle. Os animais pinealectomizados e tratados com estrógeno apresentaram maior taxa de crescimento tumoral e os animais sham-pinealectomizados tratados com estrógeno e melatonina exibiram uma maior percentagem de inibição tumoral. A sobrevida foi menor nos grupos pinealectomizados e tratados com estrógeno.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estrógeno, melatonina, pinealectomia, sobrevida, tumor.

### MELATONIN AND ESTROGEN ACTION ON TUMOR GROWTH OF SWISS MICE IMPLANTED WITH EHRLICH TUMOR

**ABSTRACT:** The aim of this study was to evaluate the melatonin and estrogen action on tumor growth and survival of Swiss mice

**RESUMO:** O objetivo deste estudo foi avaliar ação da melatonina e do estrógeno sobre o crescimento tumoral e sobrevida de Camundongos Swiss implantados com tumor

implanted with Ehrlich tumor. We used 56 female Swiss mice (*Mus musculus*), 60 days of age, divided into seven experimental groups (n = 8 animals/group): A- Estrogen and melatonin treated pinealectomized; B- Estrogen and melatonin treated sham-pinealectomized; C- Estrogen treated pinealectomized; D- Estrogen treated Sham-Pinealectomized; E- Estrogen vehicle treated pinealectomized; F- Estrogen vehicle treated sham-pinealectomized; G- Control. Estrogen treated pinealectomized animals had a higher tumor growth rate, and estrogen and melatonin treated sham-pinealectomized animals exhibited a higher percentage of tumor inhibition. Survival was lower in pinealectomized and estrogen treated groups.

**KEYWORDS:** Estrogen, melatonin, pinealectomy, survival, tumor.

## 1 | INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais comum entre as mulheres em todo o mundo (INCA, 2014). A etiologia do tumor mamário é multifatorial, com a participação de fatores genéticos, ambientais, nutricionais e hormonais (SALAZAR *et al.*, 2016). A forma como diferentes hormônios atuam estimulando ou inibindo o processo de crescimento tumoral tem sido estudada, buscando-se compreender a interação entre estes e suas implicações para o metabolismo celular. Dentre os hormônios que interferem na dinâmica do crescimento tumoral estão o estrógeno (LEI *et al.*, 2019) e a melatonina (SU *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, têm-se empregado o tratamento hormonal à base de estrógeno como método de prevenção, visando o controle populacional. (BORGES; TORRESAN, 2018). A utilização de terapia hormonal com fins contraceptivos ou em casos de dismenorreia, irregularidades do ciclo menstrual, gravidez ectópica, inflamação pélvica, entre outros, provocam predisposição ao aparecimento de neoplasia mamária (MORCH *et al.*, 2017).

A melatonina, ao contrário do estrógeno, inibe o crescimento e proliferação de células cancerígenas, além de reduzir a incidência de metástase (BORIN *et al.*, 2016) e a gênese tumoral, limitando danos no DNA, que precede a mutação necessária para o desenvolvimento do tumor (LIU *et al.*, 2013).

Em virtude de similaridades biológicas com as neoplasias mamárias humanas, o tumor de Ehrlich tem despertado o interesse de pesquisadores para empregá-lo como modelo comparativo para o estudo desta patologia. A vantagem de estudar o carcinoma de Ehrlich está no conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais, na alta capacidade de transplante e no desenvolvimento rápido da neoplasia que restringe o tempo de estudo (KABEL *et al.*, 2013). O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da melatonina e do estrógeno sobre o crescimento tumoral e sobrevida de Camundongos Swiss implantados com

tumor de Ehrlich.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e aprovado sob o número 016921/2012.

Foram utilizados 56 camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*), de 60 dias de idade, alojadas em caixas padronizadas para a espécie e mantidos em condições ambientais ( $22\pm 1^\circ\text{C}$  e UR 50%), sob um programa de luz contínuo de 12h/dia, com água e alimentação *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em sete tratamentos com  $n=8$  por unidade experimental (Tab. 1).

<i>Tratamento</i>	<i>Pinealectomizados</i>	<i>Sham-pinealectomizados</i>
<b>Estrógeno e Melatonina</b>	A	B
<b>Estrógeno</b>	C	D
<b>Veículo do Estrógeno</b>	E	F
<b>Controle</b>		G

Tabela 1. Tratamento dos grupos experimentais.

A pinealectomia foi realizada segundo o método preconizado por Maganhin *et al.* (2009). Para eliminar falsos resultados, o mesmo procedimento foi realizado nos animais do grupo Sham, mas sem a retirada da glândula pineal.

A melatonina foi administrada durante 60 dias anteriores à implantação do tumor e 12 dias após o implante tumoral, na dose de  $2\ \mu\text{g/g}$  de peso corporal, entre o período das 18:00 às 19:00 horas (PRATA-LIMA; BARACAT; SIMÕES, 2004), por via subcutânea. A melatonina cristalina (Sigma Chemical Co, Et. Louis, Mo., USA) foi dissolvida em 0,1 mL de NaCl contendo 5% de etanol. O grupo controle recebeu inoculações diárias de 0,1 mL do veículo por via subcutânea (REDINS; REDINS; NOVAES, 2000).

O benzoato de estradiol foi administrado durante o mesmo tempo que a melatonina, por via subcutânea, na dose de  $20\ \mu\text{g/kg}$ . A solução de benzoato de estradiol foi preparada dissolvendo-se o produto em óleo de amendoim estéril, que é o veículo original do produto, de tal forma que a dosagem ficou contida em 0,1 mL da solução (VICELLI; GURGEL; ALVARENGA, 2006).

A aplicação das células tumorais nos grupos experimentais procedeu-se ao 60º dia de experimento. Os animais receberam uma injeção subcutânea na região axilar direita de 0,05 mL da suspensão celular, contendo  $2,5 \times 10^6$  células tumorais eluídas em solução de Ringer pH 7,4 (DAGLI, 1989).

Foram realizadas medidas diárias dos diâmetros da projeção superficial externa do tumor a partir do quinto dia após a inoculação das células tumorais, com auxílio de paquímetro. O volume do tumor foi estimado pela fórmula  $V = 4/3 \cdot \pi \cdot (R_1 \cdot R_2 \cdot R_3)$ , onde R1, R2 e R3 são os raios do tumor em seus três planos perpendiculares (BOURSOT *et al.*, 2009). Em cada tratamento foi obtida a função que descreve a variação do volume do tumor Ehrlich em função do tempo, determinando-se a razão entre os coeficientes angulares de cada equação obtida. Para a determinação da taxa de variação infinitesimal do volume do tumor de Ehrlich em função do tempo, foi determinada a derivada primeira de cada função matemática, comparando-se dois momentos distintos de desenvolvimento do tumor, um no primeiro dia após confirmação do início de crescimento do tumor na forma sólida, e um segundo ponto ao décimo segundo dia; sendo a variação média da velocidade de crescimento do tumor obtida para este intervalo temporal.

As diferenças estatísticas foram determinadas mediante aplicação do teste estatístico t de Student, considerando-se um nível descritivo equivalente a um valor de  $p < 0,05$ . O percentual de inibição tumoral também foi calculado tomando-se como referência a média da massa dos tumores de Ehrlich em cada grupo, avaliada no 12º dia do início do acompanhamento, empregando-se a equação  $I\% = (C - T)/C \times 100$  proposta por Sousa *et al.* (2010), onde C = peso médio dos tumores dos grupos controle; T= peso médio dos tumores dos grupos tratados.

Para a determinação da sobrevivência, os animais dos grupos experimentais foram observados diariamente, após a inoculação do tumor de Ehrlich, durante o período de 12 dias. A partir desse monitoramento, foi realizado o registro da mortalidade diária e posteriormente calculada a taxa e a percentagem média de sobrevivência (QURESHI *et al.*, 2001). A avaliação estatística desse parâmetro foi realizada aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos ( $p > 10\%$ ). Para os dados com distribuição gaussiana realizou-se uma ANOVA e um teste post-hoc de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ). Os dados com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn ( $\alpha = 5\%$ ).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tumor de Ehrlich desenvolveu-se de forma característica conforme o tipo de tratamento empregado, como pode ser observado na figura 1. Para uma melhor análise obteve-se os parâmetros de regressão das funções matemáticas que descreviam a variação de volume do tumor de Ehrlich ao longo do tempo, cujos dados podem ser visualizados na tabela 2.

Nesta tabela verificamos que em todos os tratamentos a variação de

crescimento do tumor de Ehrlich pode ser descrita por uma função do tipo  $y = a \cdot \ln x + b$ , onde “y” representa o volume do tumor (cm<sup>3</sup>), “a” o coeficiente angular (cm<sup>3</sup>/dia), “b” o coeficiente linear (cm<sup>3</sup>) e “x” um determinado tempo de desenvolvimento (dias), obtendo-se para todos os tratamentos um coeficiente de determinação  $R^2 > 0,85$ , que por sua vez sinaliza uma boa descrição matemática, por meio da qual verificou-se que a razão entre o coeficiente angular obtido para cada tratamento em relação ao coeficiente angular obtido para o grupo controle, foi afetada por alguns tratamentos de forma significativa.

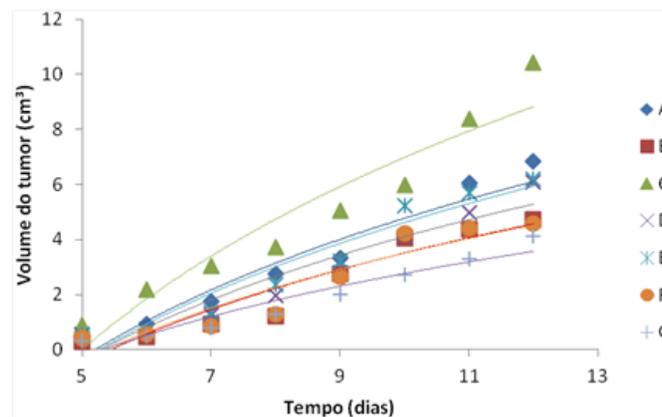


Figura 1. Comportamento do crescimento tumoral do 6º ao 12º após o implante do tumor. A- Pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. C- Pinealectomizado tratado com estrógeno. D- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno. E- Pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. G- Controle.

Os animais pertencentes ao grupo A apresentaram um aumento significativo na velocidade de variação de volume do tumor em relação aos animais do grupo controle, em cerca de  $66 \pm 33\%$ . Entretanto, nesta mesma tabela 2 pode-se verificar que animais Grupo B não exibiram aumento da velocidade de variação de volume tumoral em período similar de desenvolvimento, mostrando um comportamento similar aquele observado em relação ao grupo controle, para um valor de  $p < 0,05$ .

Vale, entretanto, salientar que a velocidade de variação de volume do tumor de Ehrlich apresentada pelos animais do grupo A foi superior estatisticamente ( $t=2,118$ ) em relação à velocidade de variação de volume apresentada pelos animais do grupo B. Estes dados sugerem que a pinealectomia contribuiu para o aumento do crescimento do tumor de Ehrlich. Pode-se verificar que o grupo C apresentou um aumento significativo na velocidade de crescimento tumoral, de  $129 \pm 31\%$  em relação ao grupo controle, grupo D ( $t=5,270$ ), e ao grupo E ( $t=4,220$ ), considerando-se um valor de  $p < 0,05$ . É importante ainda mencionar que tanto o grupo D como o grupo E apresentou um aumento significativo na velocidade de crescimento tumoral de  $47 \pm 25\%$  e de  $64 \pm 30\%$  respectivamente, em relação aos animais do grupo

controle, para um valor de  $p < 0,05$ .

Grupo	a	(-) b	R <sup>2</sup>	Razão	Valores de t
A	7,30 ± 1,82	12,04 ± 4,18	0,93	1,66±0,33	2,224*
B	5,77 ± 1,39	9,79 ± 2,37	0,90	1,31±0,33	1,077
C	10,06 ±2,24	16,19 ± 3,86	0,91	2,29±0,31	4,609*
D	6,45± 0,84	10,75 ± 1,16	0,91	1,47±0,25	2,054*
E	7,21 ± 1,51	11,98 ± 2,53	0,92	1,64±0,30	2,357*
F	5,61 ± 1,79	9,42 ± 3,15	0,88	1,28±0,39	0,797
G	4,40 ± 0,96	7,35 ± 1,51	0,91	1,00±0	-

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros de regressão das funções matemáticas que descrevem a variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos sob diferentes condições de tratamento. Uma comparação estatística da Razão entre os respectivos coeficientes angulares em relação ao grupo controle.

A- Pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. C- Pinealectomizado tratado com estrógeno. D- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno. E- Pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. G- Controle. Coeficiente angular "a", Coeficiente linear "b", Coeficiente de determinação "R<sup>2</sup>", teste t de Student para as razões entre os coeficientes angulares em relação ao grupo controle. \* diferença significativa para um valor de  $p < 0,05$ , considerando-se um valor crítico  $t = 1,761$  (14 gl.).

Estes dados sugerem que a pinealectomia contribui para a velocidade de variação volume do tumor de Ehrlich, em animais tratados somente com estrógeno, e que este efeito foi bem mais pronunciado do que em relação aos animais pinealectomizados tratados com estrógeno e melatonina (Grupo A), o que sugere um efeito de contenção de crescimento do tumor protagonizado pela melatonina. É interessante também destacar que em animais pinealectomizados, os componentes do veículo do estrógeno foram suficientes para promover crescimento do tumor em relação aos animais sham pinealectomizados tratados com veículo (Grupo F) ( $t=2,091$  contra  $t$  crítico = 1,761 para 14gl), para um valor de  $p < 0,05$ .

A remoção da glândula pineal parece contribuir para a mobilização de fatores que estimulam o crescimento do tumor de Ehrlich, principalmente em presença de estrógeno (Grupo C). Mas, o tratamento prévio dos animais com melatonina evitou o crescimento do tumor em animais sham pinealectomizados tratados com o estrógeno (Grupo B), no entanto não evitou o crescimento do tumor quando os animais eram pinealectomizados e recebiam também o estrógeno (Grupo A). Em outras palavras, a melatonina exógena conseguiu evitar as transformações bioquímicas endógenas protagonizadas pela presença de estrógeno, mas não conseguiu realizar este efeito com a mesma eficiência quando os animais tratados com estrógeno não possuíam a glândula pineal, denunciando a importância da participação dos componentes deste tecido glandular, em especial a melatonina endógena, sobre o controle do desenvolvimento do tumor de Ehrlich.

Ali; El-Domeiri; Gupta (1973), já haviam demonstrado que a pinealectomia

promovia o desenvolvimento de determinadas linhagens de tumores, especialmente o desenvolvimento de melanoma em hamsters, atribuindo este efeito à diminuição dos níveis de melatonina endógena, em até 80%.

A melatonina produzida pela pineal tem uma importante participação nos mecanismos que regulam os ritmos endógenos de atividade metabólica, podendo ter papel decisivo na no retardo da progressão do câncer através da inibição da proliferação de células tumorais (BORIN *et al.*, 2016), além de participar na regulação de genes envolvidos em vias de reparo do DNA, apresentando papel decisivo sobre o ciclo celular e desempenhando papel protetor no desenvolvimento de neoplasias (LIU *et al.*, 2013).

Entretanto, os efeitos supressores da melatonina sobre tecidos tumorais parecem depender de fatores relacionados ao fotoperíodo (FISHER, 2009). Esta informação corrobora com o fato de que a simples presença de melatonina nos tecidos biológicos não é suficiente para conter as consequências das transformações genéticas e metabólicas apresentadas pelas células que estão envolvidas no processo de transformação neoplásica, se não vier acompanhada de outros sinais concorrentes, derivados do envolvimento orquestrado de outros tecidos, ritmicamente sincronizados, como acreditamos que tenha ocorrido nos grupos onde os animais foram sham pinealectomizados tratados com estrógeno e melatonina.

Por outro lado, estudos revelam que o estrógeno pode interagir com diferentes domínios do tecido mamário afetando mecanismos que controlam o ciclo celular (RUSSO & RUSSO, 2006). Evidências mais diretas assinalam que o estrógeno interfere na expressão do gene bcl-2, que controla o processo de apoptose em células neoplásicas, sendo este processo relativamente defasado tardiamente, favorecendo ao crescimento da massa tumoral (SUH *et al.*, 2003).

De qualquer forma, os animais do grupo D desenvolveram o tumor de Ehrlich, o que significa que a produção natural de melatonina pela pineal não foi suficiente para prevenir o desenvolvimento do tumor de Ehrlich neste grupo experimental.

Numa tentativa de melhor compreender o processo de crescimento tumoral em cada condição de tratamento, procurou-se obter a derivada primeira em relação às respectivas funções que descreviam a variação de crescimento tumoral ao longo do tempo. Verificou-se, portanto, que a função derivada era do tipo  $y' = a/x$  onde  $y'$  representava a variação infinitesimal do volume do tumor de Ehrlich ao longo do tempo ( $\text{cm}^3/\text{dia}^2$ ), “a” o coeficiente angular ( $\text{cm}^3/\text{dia}$ ), e “x” o tempo (dias).

Aqui é importante ressaltar que a variação infinitesimal do crescimento tumoral, que expressa à rapidez com que o tumor modifica o seu volume, ou melhor, dizendo, reduz a taxa de crescimento da massa tumoral, está genuinamente associada às características cinéticas da célula neoplásica em resposta à sinalização disponível no contexto endógeno em que o tumor se desenvolve. Sendo esta taxa infinitesimal

fundamentalmente dependente do tempo verificou-se que a cada momento o tumor apresentava uma taxa de crescimento cada vez menor. Pode-se dizer que o tumor de Ehrlich, nos nossos experimentos, apresentou fases distintas de desenvolvimento, bem provavelmente, de acordo com as transformações genéticas e os novos desafios metabólicos a serem vencidos.

Com o aumento do número de células cancerígenas numa massa tumoral, aumenta-se de sobremaneira a competitividade por nutrientes e por oxigênio, onde as etapas subsequentes de crescimento vão depender da disponibilidade e da qualidade da rede circulatória construída para atender as demandas do tecido tumoral. Como resposta a estas condições, geralmente identificam-se uma população variada em termos de células neoplásicas e suas respectivas fases no ciclo celular, como um aumento na quantidade de células mortas.

Na tabela 3 podem ser visualizados os valores da derivada primeira obtidos para cada condição de tratamento, em dois momentos temporais distintos: um no primeiro dia de monitoramento do crescimento tumoral, e outro ao 12º dia. A diferença entre as derivadas neste intervalo foi obtida, efetuando-se uma razão entre as respectivas diferenças para cada tratamento em relação ao tempo de 11 dias de monitoramento do crescimento do tumor de Ehrlich em cada caso. Este parâmetro, assim construído, caracterizaria o que poderíamos denominar de taxa de desaceleração média de crescimento tumoral - TDMCT.

Grupo	1º dia	12º dia	Diferença	TDMCT (cm <sup>3</sup> /dia <sup>2</sup> )	Valor de t
<b>A</b>	7,303±1,822	0,608±0,152	-6,694±1,829	0,609±0,152	1,595
<b>B</b>	5,775±1,390	0,481±0,116	-5,294±1,395	0,481±0,116	0,992
<b>C</b>	10,062±2,242	0,839±0,187	-9,224±2,249	0,839±0,187	2,528*
<b>D</b>	6,453±0,841	0,538±0,070	-5,916±0,844	0,538±0,070	2,448*
<b>E</b>	7,210±1,515	0,601±0,126	-6,609±1,521	0,601±0,126	1,858*
<b>F</b>	5,612±1,795	0,468±0,150	-5,144±1,801	0,468±0,150	0,678
<b>G</b>	4,396±0,960	0,366±0,080	-4,029±0,963	0,366±0,080	-

Tabela 3. Taxa de variação infinitesimal do volume do tumor em função do tempo, avaliada em dois momentos distintos do desenvolvimento do tumor de Ehrlich conforme o tipo de tratamento aplicado em cada grupo experimental. Taxa de desaceleração média de crescimento tumoral – TDMCT.

A- Pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. C- Pinealectomizado tratado com estrógeno. D- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno. E- Pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. G- Controle. Teste t de Student. \* Diferença significativa em relação ao controle, para um valor de p < 0,05 (Valor crítico t = 1,761 para 14gL).

Assim, verificou-se uma diferença significativa entre os grupos C, D e E em relação ao grupo controle, que em outras palavras significa que animais tratados somente com estrógeno, independentemente de serem eles pinealectomizados ou

não, apresentaram uma TDMCT significativa em relação ao grupo controle, embora o efeito do estrógeno em animais pinealectomizados foi mais pronunciado do que em animais sham pinealectomizados, para um valor de  $p < 0,05$ . Esta resposta pronunciada de desaceleração observada nos animais do grupo C talvez esteja relacionada com mudanças na sensibilidade do tumor quanto à presença de estrógeno, na medida em que o tumor de Ehrlich atingia um tamanho crítico, como, de certa forma, foi também assinalado por Geraldine; Gartner; Shmitt (2000).

Também é interessante chamar a atenção para o fato de que a TDMCT obtida para os animais do grupo A não diferiu estatisticamente em relação à obtida para os animais do grupo controle, nem tão pouco em relação aos animais do grupo B, para um valor de  $p < 0,05$ . Nestes grupos a taxa de desaceleração foi a mesma, significando que a contribuição da melatonina endógena, oriunda da atividade da glândula pineal não afetou este mecanismo, uma vez que a presença de pinealectomia foi indiferente quanto a este tipo de resultado, muito embora na ausência de melatonina exógena a pinealectomia em presença de estrógeno tenha proporcionado aumento na TMDCT.

Trabalhos têm assinalado que melatonina pode proporcionar um efeito antiproliferativo sobre células cancerígenas (SRINIVASAN *et al.*, 2008), principalmente em decorrência de seu possível efeito protetor contra danos oxidativos induzidos por radicais livres, geralmente presentes no entorno de tecidos neoplásicos em expansão, bem provavelmente, afetando sistemas enzimáticos que controlam ações antioxidantes, em especial a redução dos níveis de peroxidação lipídica (AKCAY; YALCIN; SOZMEN, 2005).

Curiosamente, os animais tratados com o veículo para o estrógeno também apresentaram uma TDMCT maior em relação aos animais do grupo controle, para um valor de  $p < 0,05$ . Como já foi dito acima, esta resposta pode estar associada à presença de substratos ativos na composição lipídica do óleo de amendoim proporcionando ações moleculares importantes sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich.

Em linhas gerais pode-se dizer que a desorganização nos mecanismos de temporização endógenos resultante da retirada da pineal, parecem diminuir a competência do organismo em controlar melhor os sinais bioquímicos trocados entre os diferentes tecidos (MENNA-BARRETO & WEY, 2007), criando padrões de sinalização temporal que venham a favorecer o desenvolvimento do próprio tumor.

Como complemento da avaliação do desenvolvimento do tumor de Ehrlich nas diferentes condições de tratamento acima sugeridas, avaliou-se também as configurações macroscópicas do tecido tumoral obtido no final dos experimentos, determinando-se em cada caso o percentual de inibição tumoral, cujos dados podem ser visualizados na figura 2.

Na figura 2, a partir da avaliação do percentual de inibição tumoral (I%) verificou-se que animais pinealectomizados tratados com estrógeno mais melatonina apresentaram crescimento do tumor em 34,67% (Grupo A), embora em animais sham pinealectomizados, sob mesma condição de tratamento, tenha-se obtido um valor de I% = 38,47%, sugerindo que a presença de melatonina endógena decorrente da participação da atividade da glândula pineal e os sinais bioquímicos decorrentes da sincronização metabólica controlaram melhor o desenvolvimento do tumor de Ehrlich. No grupo C, onde os animais pinealectomizados recebiam estrógeno, exibiram um crescimento da massa tumoral equivalente a 65,22%, enquanto que no grupo de animais sham pinealectomizados tratados com estrógeno (Grupo D) não foi observada massa de tumor significativa que denotasse inibição ou crescimento tumoral, assim como nos grupos E e F de tratamentos.

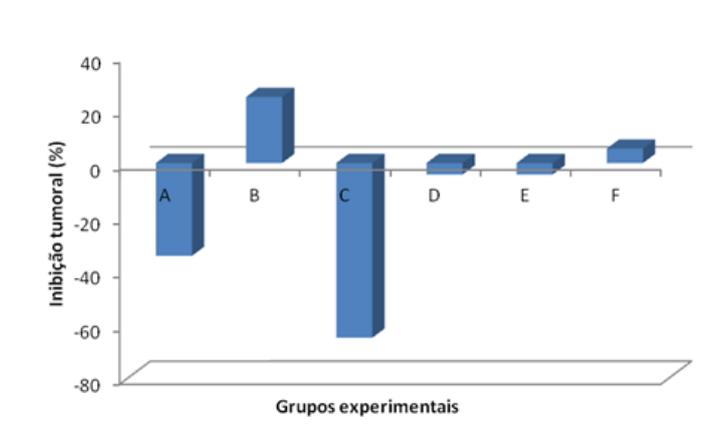


Figura 2. Inibição do crescimento do tumor de Ehrlich. A- Pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. B- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno e melatonina. C- Pinealectomizado tratado com estrógeno. D- Sham-pinealectomizado tratado com estrógeno. E- Pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno. F- Sham-pinealectomizado tratado com o veículo do estrógeno.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com estudos que mostram que o estradiol apresenta efeito proliferativo no parênquima mamário (TORRES *et al.*, 2011) conduzindo-o a uma condição de desempenho máximo (NAIR *et al.*, 2010), a partir da sua interação sobre vários sítios de atividade celular, em especial a sua ligação a receptores intracelulares que modulam a expressão de genes especiais e, conseqüentemente, a síntese de proteínas específicas que atuam em vários domínios do ciclo celular (SCHMIDT, 2000).

Quanto aos efeitos da melatonina, resultados semelhantes aos nossos achados podem ser visualizados em Martinez-Campa (2005), em que a melatonina preveniu a promoção e o crescimento de tumores mamários espontâneos ou induzidos quimicamente em roedores. Alguns trabalhos também sugerem que a melatonina possa exercer efeitos protetores contra o crescimento neoplásico pela inibição da atividade da enzima aromatase, geralmente envolvida na conversão de substratos

androgênicos em estrogênios (COS *et al.*, 2006). Em células de câncer de mama, a melatonina pode suprimir a proliferação induzida por estrogênio, através da inibição da atividade transcricional dos receptores de estrogênio  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) (ALVAREZ-GARCIA *et al.*, 2013).

## 4 | CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que o estrogênio e a melatonina interferem nos mecanismos regulatórios dos processos de crescimento do carcinoma mamário. O estrogênio exógeno atua como promotor do crescimento tumoral e a melatonina inibe o crescimento do tumor de Ehrlich sólido. A melatonina exógena reduz o crescimento tumoral mesmo em animais tratados com estrogênio, sendo de fundamental importância no tratamento de tumores estrogênio-dependentes.

## REFERÊNCIAS

- AKCAY, Y. D.; YALCIN, A.; SOZMEN, E.Y. The effect of melatonin on lipid peroxidation and nitrite/nitrate levels, and on superoxide dismutase and catalase activities in kainic acid-induced injury. **Cell Mol Biol Lett**, v. 10, p. 321-329, 2005.
- ALI, A. H.; EI-DOMEIRI; GUPTA T. K. D. Reversal by Melatonin of the Effect of Pinealectomy on Tumor Growth1. **Cancer Research**, v. 33, p. 2830-2833, 1973.
- ALVAREZ-GARCIA, V. *et al.* Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. **Microvasc Res**, v. 87, p. 25–33, 2013.
- BORGES, J. B. R.; TORRESAN, R. Z. Breast cancer and hormonal contraception: Should we rethink our concepts? **Rev Assoc Med Bra**, v. 64, n. 3, p. 201-203, 2018.
- BORIN, T. F. *et al.* Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression. **J Pineal Res**, v. 60, n. 1, p. 3-15, 2016.
- BOURSOT, C. *et al.* Segmentation automatique du volume tumoral des cancers pulmonaires non à petites cellules sur la 18F-FDG TEP-TDM en vue d'un traitement par radiothérapie. **Médecine Nucléaire**, v. 33, p. 440–449, 2009.
- DAGLI, M.L.Z. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: Estudo experimental.** 1989. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.
- Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2014.
- KABEL, A. M., et al. Effect of atorvastatin and methotrexate on solid Ehrlich tumor. **Eur J Pharmacol**, v. 713, p. 47-53, 2013.
- LEI, J.T. et al. ESR1 alterations and metastasis in estrogen receptor positive breast cancer. **J Cancer Metastasis Treat**, v. 5, n. 38, 2019.
- LIU, R.; FU, A. et al. Melatonin enhances DNA repair capacity possibly by affecting genes involved in

DNA damage responsive pathways. **BMC Cell Biol**, v. 14, n. 1, 2013.

MARTINEZ-CAMPA, C. et al. Melatonin enhances the inhibitory effect of aminoglutethimide on aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 94, n. 3, p. 249-254, 2005.

MENNA BARRETO, L.; WEY, D. Ontogênese do sistema de temporização – a construção e as reformas dos ritmos biológicos ao longo da vida humana. **Psicologia USP**, v. 18, n. 2, p. 133-153, 2007.

MORCH, L. S. et al. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. **N Engl J Med**, v. 377, p. 2228-2239, 2017.

NAIR, R. et al. Redefining the expression and function of the inhibitor of differentiation 1 in mammary gland development. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. 11947, 2010.

PRATA-LIMA, M. F.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. J. Effects of melatonina on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 987-995, 2004.

QURESHI, S. et al. Boric acid enhances *in vivo* Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. **Toxicology**, v. 165, p.1–11, 2001.

REDINS, G. M.; REDINS, C. A.; NOVAES, J. C. The effect of treatment with melatonin upon the ultrastructure of the mouse pineal gland: a quantitative study. **Brazilian Journal Biology**, v. 61, n. 4, p. 679-684, 2000.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 102, p. 89-96, 2006.

SALAZAR, M. J. B. et al. Asociación del cáncer de mama con síndrome metabólico y estado nutricional en mujeres en Querétaro, México. **Actualización en Nutrición**, v. 17, n. 4, p. 102-108, 2016.

SCHMIDT, B. M. et al. Rapid, nongnomic steroid actions: A new age? **Frontiers Neuroendocrinology**, v. 21, n. 1, p. 57-94, 2000.

SOUSA, E. L. et al. Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (Janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, 2010.

SUH, K. S. et al. Soybean inhibit tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. **Phytochemistry Reviews**, v. 63, p. 209-215, 2003.

SRINIVASAN, V. et al. Melatonin, environmental light, and breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 108, p. 339-350, 2008.

SU, S. C. et al. Cancer metastasis: Mechanisms of inhibition by melatonin. **J Pineal Res**, v. 62, n. 1, p. e12370, 2017.

TORRES, S. M. P. S. et al. Histomorfometria da mama de ratas tratadas com estrogênio e/ou progesteragênio. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 2, p. 177-181, 2011.

VICELLI, T. J.; GURGEL, M. S. C.; ALVARENGA, M. Histologia mamária após o uso de esteroides sexuais – estudo em ratas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 5, p. 369-374, 2006.



## AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA CONSERVAÇÃO DE PEÇAS ANATÔMICAS E SUAS APLICAÇÕES CONSCIENTES NO LABORATÓRIO DE ANATOMIA ANIMAL

**Mariana Biscaro Zófoli**

Doutoranda

E-mail: marianazofoli@hotmail.com

**Jorge Gonçalves Pires**

Químico colaborador

**Camila Ramos De Oliveira Nunes**

Doutoranda

**Ana Bárbara Freitas Rodrigues**

Professora, Msc, Dsc

**Stefany Martins De Almeida**

Aluna de Graduação

**Gina Nunes Teixeira**

Técnica de nível superior

**Leonardo Siqueira Glória**

Professor, Msc, Dsc

**Raphael Weller Ferreira Menassa**

Aluno de Graduação. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro/UENF – Campos dos Goytacazes/RJ

**RESUMO:** O formaldeído é utilizado nos laboratórios de anatomia como um fixador e conservante padrão, apesar de sua toxicidade ser reconhecida. Esse trabalho avaliou diferentes conservantes, como uma alternativa ao uso do formol e a viabilidade desses métodos alternativos para conservação de peças anatômicas na Seção de Anatomia Animal, tendo como parâmetros a preservação morfológica

das peças. Foram utilizadas estômagos, rins e pulmões de suíno. Estas foram devidamente lavadas, dissecadas, pesadas, mensuradas (comprimento e largura) e fixadas em solução de formol a 10% por 48 horas. Depois de fixadas, as peças foram transferidas para as soluções conservadoras, onde foram mantidas, sob avaliação, por um período de três meses. As soluções testadas foram: formol em gel 10%, formol em gel 15%, álcool em gel 70% e técnica de glicerinação (com glicerina loira). Estas foram comparadas com a solução controle de formol aquoso a 10%. As peças glicerinadas e as conservadas em álcool em gel 70% obtiveram uma mudança de consistência, discreta alteração morfométrica, porém sem alterações morfológicas. O método de glicerinação se mostrou mais viável em relação ao uso do formol, pois é um meio atóxico, proporcionando assim um melhor ambiente laboral, além de facilitar o armazenamento das peças, estas, apresentaram uma coloração mais amarelada, devido à glicerina loira. O estudo mostrou que a solução de formol em gel 10%, se mostrou menos volátil em relação aos demais grupos que continham formol em sua constituição, neste sentido se mostra necessário novas pesquisas na área de biossegurança laboral com o intuito de comprovar a substituição do formol aquoso

pelo formol em gel.

**PALAVRAS-CHAVE:** formaldeído, glicerina loira, volatilização .

**ABSTRACT:** Formaldehyde is used in anatomy laboratories as a standard fixative and preservative, although its toxicity is recognized. This study evaluated different preservatives as an alternative to the use of formaldehyde and the viability of these alternative methods for the conservation of anatomical specimens in the Animal Anatomy Section, using as parameters the morphological preservation of the specimens. Stomachs, kidneys and pig lungs were used. They were properly washed, dissected, weighed, measured (length and width) and fixed in 10% formaldehyde solution for 48 hours. After being fixed, the pieces were transferred to the conservative solutions, where they were kept under evaluation for a period of three months. The solutions tested were: 10% gel formaldehyde, 15% gel formaldehyde, 70% gel alcohol and glycerination technique (with blond glycerin). These were compared with 10% aqueous formaldehyde control solution. Glycerin parts and those stored in alcohol in gel 70% obtained a change in consistency, slight morphometric alteration, but without morphological changes. The glycerination method proved to be more viable in relation to the use of formaldehyde, as it is a non-toxic medium, thus providing a better working environment, in addition to facilitating the storage of the pieces, they presented a more yellowish color due to the blond glycerin. The study showed that the 10% gel formaldehyde solution was less volatile than the other groups that contained formaldehyde in its composition, so further research is needed in the area of occupational biosafety in order to prove the replacement of aqueous formaldehyde by formaldehyde gel

**KEYWORDS:** formaldehyde, Fluoral P, blond glycerin, polymer.

## INTRODUÇÃO

Os laboratórios de anatomia recebem, para estudo, cadáveres inteiros, parte destes ou vísceras isoladas. Esses materiais são fixados para evitar a deterioração dos tecidos e preservar os elementos úteis aos estudos. A função da fixação é manter os tecidos firmes, insolúveis e protegidos contra a deterioração (RODRIGUES, 1998). A fixação através do formol é a técnica mais utilizada para a conservação de espécimes. O formaldeído é o fixador e conservante mais utilizado, comumente em solução aquosa a 10%. Por ser barato e penetrar rapidamente nos tecidos é amplamente utilizado nos laboratórios de anatomia.

Produzido através da oxidação catalítica do metanol o formaldeído é encontrado no ambiente na forma gasosa. Apesar de ser um dos fixadores mais comumente empregados no Brasil juntamente com o álcool etílico, glicerina e fenol, o formaldeído é muito volátil e tóxico, e quando inalado ou ingerido, ou em contato

direto com a pele, torna-se irritante para as mucosas e conjuntivas ocular.

Mais de 90% do formaldeído inalado é absorvido no trato respiratório superior, podendo também penetrar pela via dérmica (VIEGAS, et al., 2010). Em 1995, a Agência Internacional do Câncer (IARC, 2006) classificou o formol como cancerígeno e teratogênico (INCA, 2015).

Frente à formolização, principal técnica de fixação e conservação de peças, surgem métodos alternativos como a solução de formol gelificada e a glicerinação. A solução de formol em gel minimiza a formação de vapores pelo “aprisionamento” da molécula de aldeído ao agente gelificante, além disso, são capazes de manter as propriedades de fixação e conservação associado à baixa toxicidade (ARAÚJO, 2009).

Os protocolos de glicerinação que se baseiam na associação de glicerina e álcool absoluto têm como vantagens a leveza que as peças adquirem no processo de conservação, a preservação da morfologia das mesmas o mais próximo da forma original e a aquisição de peças com coloração mais claras que facilitam a identificação de várias estruturas de difícil visualização. Além disso, a glicerina é inodora, não irrita as mucosas, não é carcinogênica e não possui um risco de contaminação ambiental tão elevado em comparação ao formol (KRUG, et al., 2011).

Tratando-se de ambientes insalubres, a preocupação com a saúde é extremamente importante e isso se enquadra perfeitamente nos laboratórios de anatomia (VERONEZ, et al., 2010). O objetivo geral deste trabalho é avaliar a viabilidade de métodos alternativos para fixação e conservação de peças anatômicas na seção de anatomia animal, tendo como parâmetros a preservação morfológica das peças e a biossegurança laboral.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local de trabalho**

O referido trabalho foi realizado na Seção de Anatomia Animal do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA/CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). As experimentações ocorreram nos laboratórios de Microbiologia, de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) Morfologia, Ciências Químicas Wilson Gazotti Jr – LCQUI; e dependências da Seção de Anatomia Animal

(SAA).

### Dados amostrais

Após o abate dos suínos no Frigorífico PAJAM – LTDA, no distrito de Itaocara/RJ, de acordo com as normas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), sob Inspeção Estadual, foram coletados 15 estômagos, 15 rins e 15 pulmões, totalizando 45 peças. Estas foram identificadas e armazenadas isoladamente em sacos transparentes e transportadas em caixas térmicas até a seção de Anatomia Animal SAA/LMPA.

Para escolha das vísceras levou-se em consideração o volume e as características intrínsecas de cada uma. Sendo assim, caracterizamos, comparativamente, o rim como uma víscera de menor volume e de estrutura compacta; o estômago, de volume médio e constituição oca e o pulmão como uma víscera de volume grande e aerada.

### Processamento das Peças

Após a chegada na Seção de Anatomia Animal as peças passaram por diferentes processos: dissecação, lavagem em água corrente e escoamento (por 1h) para a retirada do excesso de água e em seguida as mesmas foram pesadas em balança eletrônica (Balmak Tríplice ELP – 6/15/30) e mensuradas, com fita métrica, em relação ao seu comprimento e largura. Finalmente foram fixadas em solução de formol a 10% por 48 horas em temperatura ambiente.

Na etapa de conservação das vísceras foram testadas quatro diferentes soluções: o formol em gel 10% (G2) - em processo de patente, formol em gel 15% (G3) - em processo de patente, álcool em gel 70% (G4) e técnica de glicerinação modificada (G5). Comparadas com o formol aquoso 10% (G1).

Após o escoamento, as peças dos grupos: G1, G2, G3 e G4, foram diretamente imersas em seus meios conservantes, com volume pelo menos 10 vezes maior que o das peças. As peças do G5 passaram pelo processo de glicerinação. Após o escoamento, estas foram imersas em álcool 70% por um período de sete dias, após a retirada escoamento por 30 minutos e em seguida imersas na glicerina loira e álcool etílico 95%, na proporção de 1:2. Nesta solução as peças ficaram imersas por quinze dias, seguidas de escoamento por 8 horas. Retirado o excesso de solução, as mesmas foram armazenadas novamente em suas cubas hermeticamente fechadas, sem qualquer solução. A partir do momento em que todas as peças estavam em seus respectivos conservantes, iniciou-se as avaliações tanto das peças quanto das soluções, por um período de noventa dias.

Desta forma, os seguintes parâmetros relacionados às soluções conservadoras foram avaliados: pH, turbidez, alteração de cor, alteração de odor, presença de precipitado, e presença de contaminantes. Já para as vísceras conservadas nas soluções testes foram feitas avaliações relacionadas à: morfologia, morfometria, peso, consistência, alteração de coloração, presença de manchas, presença de contaminantes e sinais de autólise.

Inicialmente as avaliações foram realizadas 24h, 48h e 72h após a permanência das vísceras nas soluções conservadoras, e passaram a ser realizadas semanalmente durante 90 dias.

### **Volatilização das peças**

Após o período de 90 dias de avaliação realizou-se a mensuração dos níveis de formol presente no ambiente laboral. O reagente aqui proposto para avaliar qualitativamente a liberação de formaldeído em amostras líquidas e gasosas é o Fluoral P, preparado pela reação de 0,3 mL de ácido acético, 0,2 mL de acetilacetona (bidestilada) e 15,4 g de acetato de amônio, completando-se o volume para um balão de 100,0 mL com água deionizada. Este reagente, quando estocado sob refrigeração e em frasco escuro, pode ser usado satisfatoriamente por até 60 dias (PINHEIRO, 2004).

Para mensurar essa volatilização, utilizou-se 25 cartuchos Strata® SI-1 Silica (55  $\mu$ m, 70 A) 200mg / 3 mL, Tubes – Phenomenex, impregnados com 5,0 mL de Fluoral P.

O ambiente escolhido para mimetizar uma sala de aula, foi uma capela com as seguintes dimensões: 45 cm de largura; 65 cm de comprimento e 68 cm de altura. O cartucho ficava preso a uma garra com o auxílio de um suporte universal, na altura de 30 cm da base, posicionado no centro da capela antes de cada medição é preciso calibrar o fluxo de ar que passa pelo cartucho para se saber o volume amostrado no interior da capela e pra isso utilizou-se o bolhômetro, que serviu para medição e ajuste da vazão na amostragem.

Com o cartucho já calibrado faz-se a medição do branco, com a capela sem as peças. O cartucho é preso na garra dentro da capela. Ao ligar a bomba conta-se cinco minutos, passado o tempo o cartucho é retirado, identificado, enrolado em papel alumínio e acondicionado dentro de um saco plástico na caixa térmica.

Coloca-se na capela as peças referentes ao grupo a ser avaliado (G5), e conta-se o tempo de cinco minutos. passado o tempo o cartucho é retirado, identificado, enrolado em papel alumínio e acondicionado dentro de um saco plástico na caixa térmica. Repete-se esses processos por mais 4 vezes. Acabada as medições as peças são retiradas e a capela é limpa com papel absorvente. Coloca-se um

ventilador ligado diretamente na janela da capela, para que ocorra a circulação de ar dentro da mesma.

Essa ventilação tem uma duração de trinta minutos, após esse tempo repete-se os onze passos novamente com o grupo seguinte, no caso G4, depois G3, G2 e G1. Após as medições de volatilização, os cartuchos são transferidos para a geladeira e espera-se pelo menos 12 horas para se dar início a eluição e leitura dos cartuchos.

Esta fase é muito simples. Os cartuchos são colocados na câmara de vácuo (Manifold, Supelco) e eluídos com 5 mL de Fluoral P. Após a eluição a leitura de fluorescência é feita no espectrofotômetro (Cary, Varian) que dará como resultado a quantidade de fluorescência na amostra.

### **Análise estatística**

Foi realizada a análise utilizando a teoria dos modelos lineares generalizados para as variáveis de morfologia, consistência, coloração, presença de precipitado, alteração de cor utilizando a distribuição Binária, e para as variáveis pH e turbidez foram utilizadas as distribuições lognormal e gama respectivamente. Para tanto, foi utilizado o procedimento GLIMMIX do software Statistical Analysis System (SAS System, Inc., Cary, NC, USA), e em caso de diferença significativa, foi aplicado o teste de Tukey.

Em relação às variáveis peso e morfometria foram analisadas com uso de modelos mistos com o procedimento PROC MIXED do software Statistical Analysis System (SAS System, Inc., Cary, NC, USA), e em caso de diferença significativa, foi aplicado o teste de Tukey.

## **RESULTADOS**

### **Consistência**

As peças foram analisadas em relação à consistência, coloração, morfometria, massa e morfologia. Na etapa de conservação das vísceras foram testadas quatro diferentes soluções: o formol em gel 10% (G2), formol em gel 15% (G3), álcool em gel 70% (G4) e técnica de glicerinação (G5), que foram comparadas a com o grupo controle composto de solução aquosa de formol a 10% (G1).

Para melhor comparação as peças deveriam apresentar uma consistência normal, ou seja, consistência tão firme quanto à peça em estado natural, tendo uma dureza levemente aumentada devido à fixação no formol, característica essa atribuída ao grupo G1.

Os estômagos dos grupos G2, G3 e G4 apresentaram uma consistência normal, sem perder a elasticidade natural da peça, já as peças do G5 apresentaram uma consistência 'emburrachada', o que é normal para peças glicerinadas. Em comparação ao grupo G1.

Os rins dos grupos G2, G3 apresentaram uma consistência normal, as peças do G4 apresentaram uma consistência friável, susceptível à rachadura. O grupo G5 apresentou uma consistência firme e endurecida, o que é normal para peças glicerinadas. Em comparação ao grupo G1.

Os pulmões dos grupos G2, G3 apresentaram uma consistência normal, sem perder a elasticidade natural, já as peças do G4 apresentaram uma consistência flácida, porém levemente elástica. O grupo G5 apresentou uma consistência 'emburrachada' e levemente menos aerada, o que é normal para peças glicerinadas. Em comparação ao grupo G1.

### Coloração

As imagens 1,2 e 3 foram tiradas no dia 90 com as peças lado a lado para melhor visualização dos resultados, podemos observar que não houve mudança de coloração entre os grupos G2 e G3, já grupo G4 apresentou uma sutil coloração amarelada, possivelmente causada pelo álcool presente em seu meio conservante. No grupo G5 observamos uma coloração amarelada mais evidente, já que nesta utilizou-se a glicerina loira, caracterizando esta coloração nas peças. Para as avaliações foi levado em consideração a coloração de cada peça e suas particularidades. . As peças foram comparadas com o grupo controle (G1).

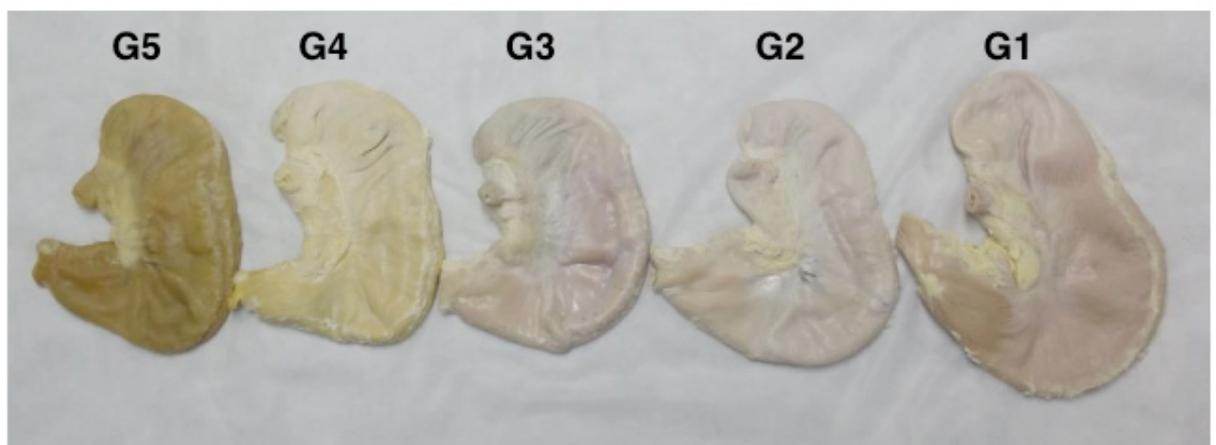


Imagem 1: Coloração apresentada pelos estômagos devido aos seus respectivos, meios conservantes. G5: glicerinção; G4: álcool em gel 70%; G3: formol aquoso 15%; G2: formol em gel 10% e G1: formol aquoso 10%.

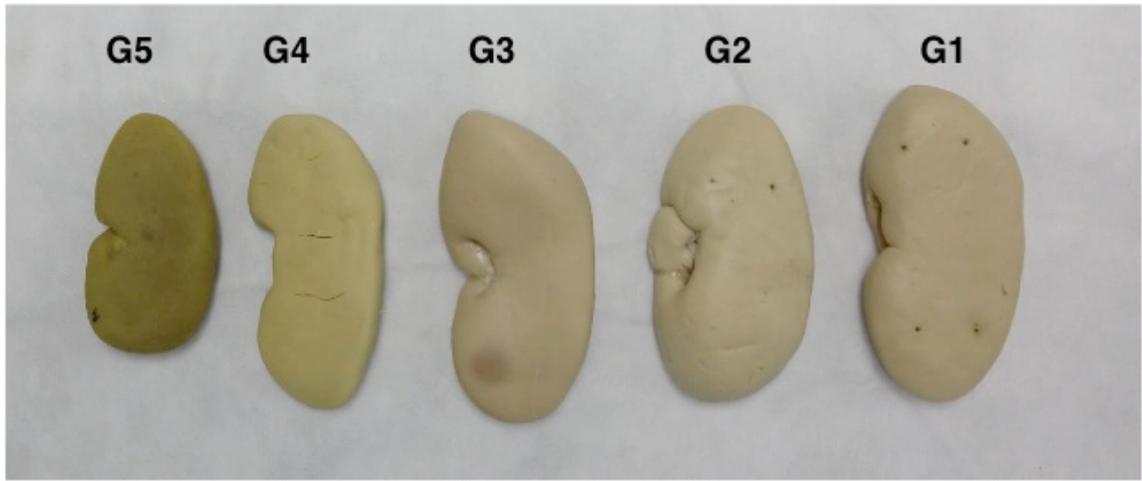


Imagem 2: Coloração apresentada pelos rins devido aos seus respectivos, meios conservantes. G5: glicerinação; G4: álcool em gel 70%; G3: formol aquoso 15%; G2: formol em gel 10% e G1: formol aquoso 10%.



Imagem 3: Coloração apresentada pelos pulmões devido aos seus respectivos, meios conservantes. G5: glicerinação; G4: álcool em gel 70%; G3: formol aquoso 15%; G2: formol em gel 10% e G1: formol aquoso 10%.

Realizou-se também análises visuais em relação à presença de manchas, presença de contaminantes e sinais de autólices nas peças. Todas as análises realizadas durante os noventa dias de avaliação obtiveram resultado negativo, corroborando com a coloração resultante.

Através do Gráfico 1 é possível identificar que os estômagos conservados nas soluções G1, G2 e G3 apresentaram redução em suas dimensões (comprimentos e larguras), caracterizando um processo de contração celular promovido pelas soluções que possuem formol em suas constituições. O G4 por sua vez demonstrou uma pequena redução no valor da largura que, de igual forma, ao estômago do G5 sofreu um processo de desidratação em função da presença de álcool em suas formulações, neste caso acarretando uma redução tanto no comprimento quanto na largura.

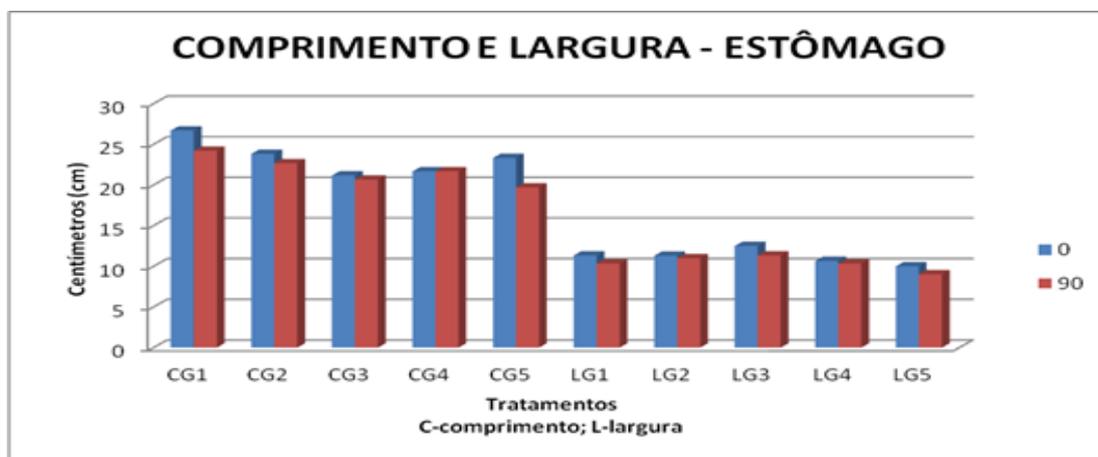


Gráfico 1: Média do comprimento e largura de estômagos (n=03), conservados em diferentes soluções: G1: solução aquosa de formol 10%; G2: solução de formol em gel 10%; G3: solução de formol em gel 15%; G4: Solução de álcool em gel 70% e G5: técnica de glicerinação modificada. C - comprimento; L - largura; Tempo inicial - 0 dia; tempo final - 90 dias.

Apesar da redução no valor de comprimento e largura dos estômagos conservados em G1, podemos observar um aumento em relação ao valor de sua massa, caracterizando a incorporação da solução aquosa de formol 10%. Já a massa dos estômagos conservados em G2 e G3 não apresentaram alteração provavelmente em função da maior dificuldade de penetração do formol em gel. Os estômagos dos G4 e G5 perderam massa em função da desidratação causada pela presença de álcool existente na constituição das soluções do G4 e G5 (Gráfico 2).

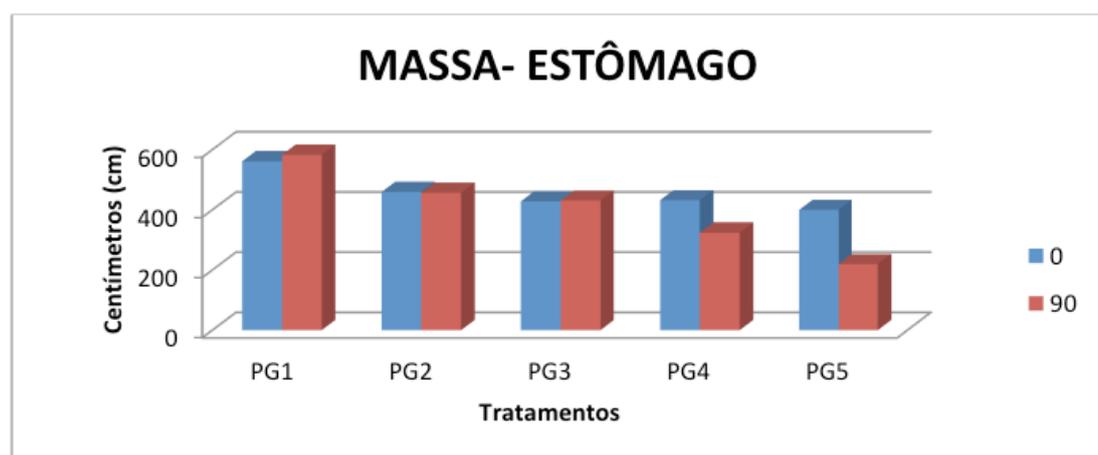


Gráfico 2: Média da massa dos estômagos (n=03), conservados em diferentes soluções: G1: solução aquosa de formol 10%; G2: solução de formol em gel 10%; G3: solução de formol em gel 15%; G4: Solução de álcool em gel 70% e G5: técnica de glicerinação modificada. C - comprimento; L - largura; Tempo inicial - 0 dia; tempo final - 90 dias.

A avaliação morfométrica do rim nos evidencia dados referentes a redução tanto no comprimento quanto na largura dos rins acondicionados em G1, G4 e G5. Em G2 e G3, apesar das peças apresentarem um aumento no valor do comprimento das peças, existiu uma diminuição nos valores referentes à largura dos mesmos

(Gráfico 3).

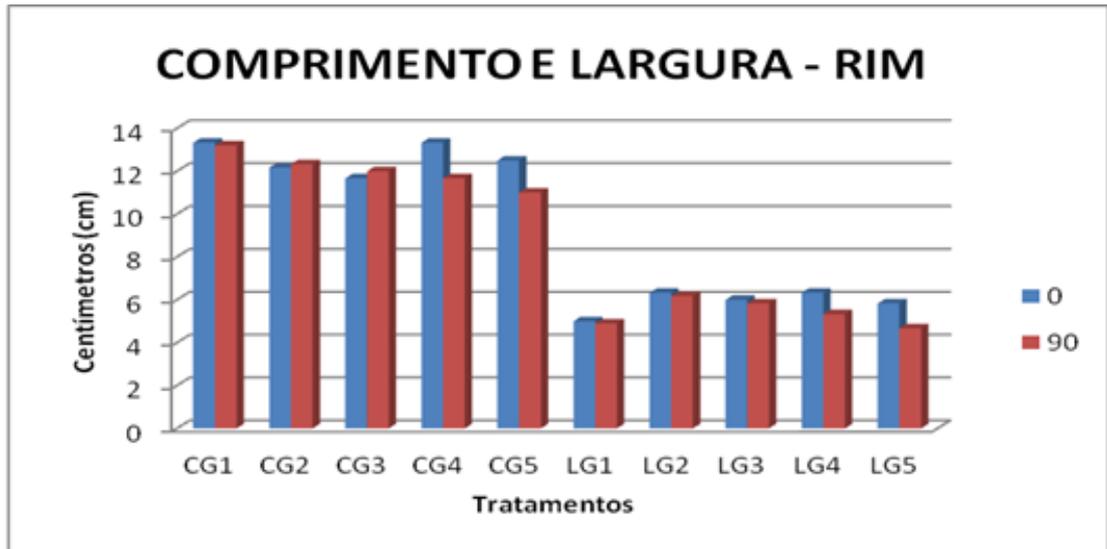


Gráfico 3: Média do comprimento e largura de rins (n=03), conservados em diferentes soluções: G1: solução aquosa de formol 10%; G2: solução de formol em gel 10%; G3: solução de formol em gel 15%; G4: Solução de álcool em gel 70% e G5: técnica de glicerinação modificada. C - comprimento; L - largura; Tempo inicial - 0 dia; tempo final - 90 dias.

A redução em relação ao comprimento e a largura dos rins conservados em G1 também se repetiu em função da massa, da mesma forma, que em G4 e G5. A desidratação causada pela presença de álcool nestas duas últimas soluções acarretaram a redução da massa dos rins. No caso de G2 e G3, a presença dos polímeros para gelificação das referidas soluções pode ter acarretado o aumento na massa dos referidos rins (Gráfico 4).

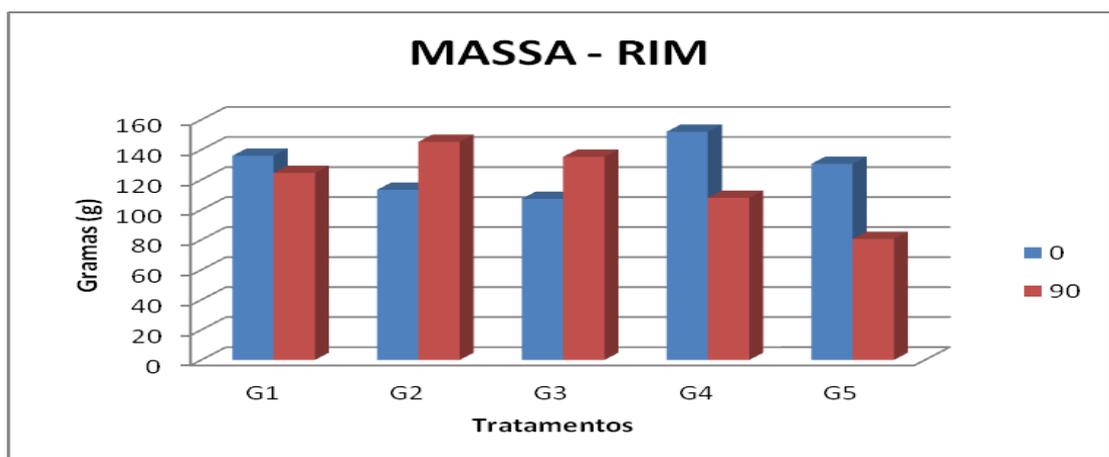


Gráfico 4: Média da massa dos rins (n=03), conservados em diferentes soluções: G1: solução aquosa de formol 10%; G2: solução de formol em gel 10%; G3: solução de formol em gel 15%; G4: Solução de álcool em gel 70% e G5: técnica de glicerinação modificada. Tempo inicial - 0 dia; tempo final - 90 dias.

No gráfico 5 é possível observar uma redução no valor de comprimento e

largura para as peças dos grupos G1, G2, G4 e G5, a penas os pulmões do G3, apresentaram aumento no comprimento. Em relação à largura, todos apresentaram uma redução nas medidas .

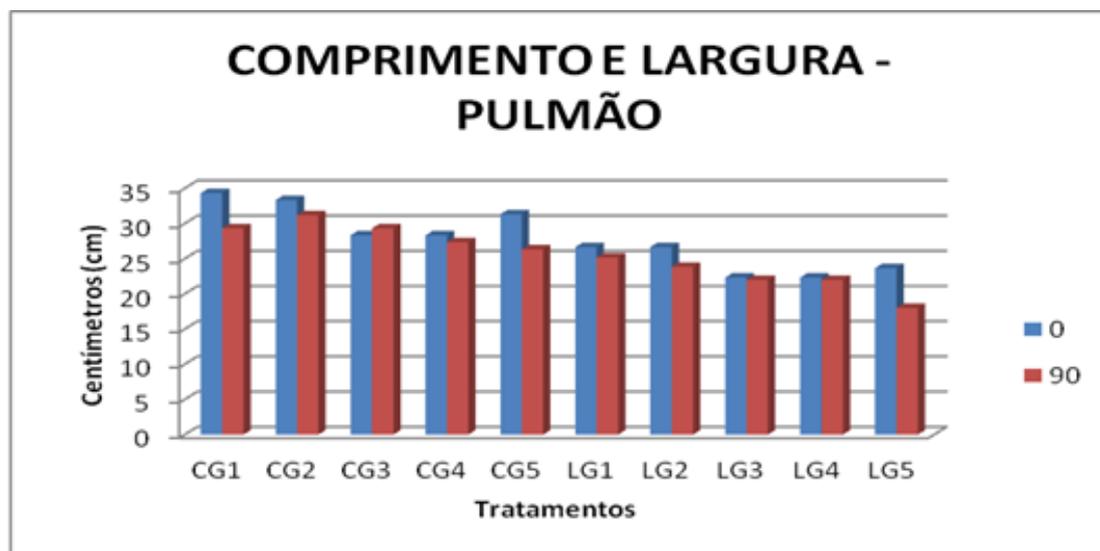


Gráfico 5: Média do comprimento e largura de pulmão (n=03), conservados em diferentes soluções: G1: solução aquosa de formol 10%; G2: solução de formol em gel 10%; G3: solução de formol em gel 15%; G4: Solução de álcool em gel 70% e G5: técnica de glicerinação modificada. C - comprimento; L - largura; Tempo inicial - 0 dia; tempo final - 90 dias.

Em relação à massa das referidas peças, G1, G2, G4 e G5 tiveram o mesmo comportamento, uma diminuição na massa. No caso do G3 o aumento na massa pode ser explicado pela presença de gel em uma solução que contém 50% a mais de formol em comparação a solução do G2. Neste sentido, sugere-se que a maior concentração de formol em uma solução gelificada possivelmente acarreta um aumento na massa em função da incorporação do formol na superfície de uma estrutura aerada.

Mesmo macroscopicamente, foi possível observar uma redução nos diâmetros das cavidades alveolares nos pulmões conservados em G2. O maior peso molecular dado pela adição do gel à formalina provavelmente acarretou uma maior susceptibilidade desse tipo de tecido aerado a sofrer compressão. Resultados semelhantes foram verificados por Araújo (2009) em experimentação realizada com formol em gel 10% para fixação de pequenas biopsias pulmonares (Gráfico 6).

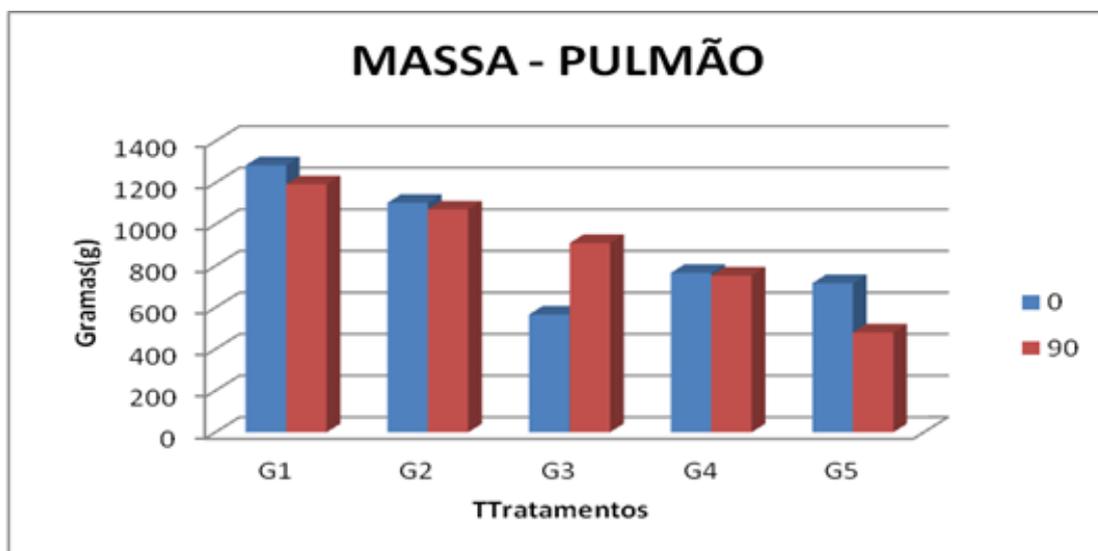


Gráfico 6: Média da massa dos pulmões (n=03), conservados em diferentes soluções: G1: solução aquosa de formol 10%; G2: solução de formol em gel 10%; G3: solução de formol em gel 15%; G4: Solução de álcool em gel 70% e G5: técnica de glicerinação modificada. Tempo inicial - 0 dia; tempo final - 90 dias.

### Análise das soluções conservadoras

As avaliações quanto aos meios conservantes foram: presença de precipitado, presença de contaminante, aspecto, cor e odor.

A precipitação é a formação de um sólido durante a reação química, este sólido é chamado de precipitado. Durante o período de avaliação observou-se que somente o grupo G4 apresentou precipitado em sua solução.

A avaliação de coloração foi realizada visualmente, tendo como parâmetro comparativo uma amostra da solução inicial (antes de receber a peça). De acordo com as análises somente os grupos G1, G3 e G4 obtiveram uma pequena mudança de coloração. As soluções que mais interagiram com as peças, apresentaram um maior grau de anormalidade.

A avaliação de aspecto foi realizada por meio de comparação da solução atual com a padrão (pré-estabelecida anteriormente), apesar da presença de precipitado e alteração de coloração todas as soluções mantiveram aspecto normal durante todos os 90 dias de avaliação.

O pH das soluções fixadoras é um dos fatores mais importantes a serem considerados no momento da fixação de um material. Os tampões estabilizam as modificações de pH que acompanham a morte celular à medida que o fixador penetra nos tecidos (ALVES 2002).

O valor ótimo de pH nos tecidos é de 6,8 a 7. Os valores de pH das soluções testadas neste experimento no tempo zero (0), antes da colocação das peças foram: G1 (5,31); G2 (6,91), G3 (6,58), G4 (6,25) e G5 (2,90). Após 90 dias, em função da interação das peças com as soluções os valores de pH foram mensurados em : G1

(4,71); G2 (5,6), G3 (5,6), G4 (5,8) e G5 (4,94). É de suma importância que o pH dos fixadores sejam avaliados pois podem ocasionar uma retração maior no tecido como também alterar a cor.

Foram realizadas análises de cultura microbiológica semeadas em agar sangue, com intuito verificar a presença de qualquer tipo de contaminante. Todas as análises realizadas durante os noventa dias de avaliação nas diferentes soluções deram negativo.

Realizou-se também uma análise olfativa e relação à alteração de odor nas soluções. Todas as análises realizadas durante os noventa dias de avaliação obtiveram resultado negativo, ou seja, não apresentaram mudança de odor dentre as características de cada solução.

### **Análise da volatilização do formol**

A avaliação da volatilização visa à mensuração dos níveis de formol presente no ambiente. A reação do Fluoral P com o formol resulta uma amostra qualitativa de fluorescência, ou seja, quanto maior a volatilização de formol no ambiente, maior será a fluorescência. A leitura das eluições foram realizadas em triplicata, para se obter uma média do nível de fluorescência .

A leitura do B1 foi realizada com o intuito de se medir a fluorescência inicial do ambiente, sem a presença das peças, sendo essa subtraída da leitura final, para que se pudesse obter uma média de fluorescência de cada tempo de amostra.

De acordo com Araújo (2009), a solução de formol uma vez gelificada, minimizaria a formação de vapores pelo “aprisionamento” da molécula de aldeído ao agente gelificante. Podemos observar tal comportamento no grupo G2 a partir do tempo 5 ao 35, em comparação o grupo G1.

O grupo G3, obteve uma fluorescência maior em todos os tempos de análise. Sua concentração de formol é 50% maior, se compararmos com o G2, por isso observou-se uma fluorescência mais elevada. Mesmo em comparação o grupo G1.

Os grupos G4 e G5 apresentaram uma fluorescência bem inferior aos demais, pois nesses dois grupos as peças só entraram em contato com o formol durante o período de fixação (gráfico 7).

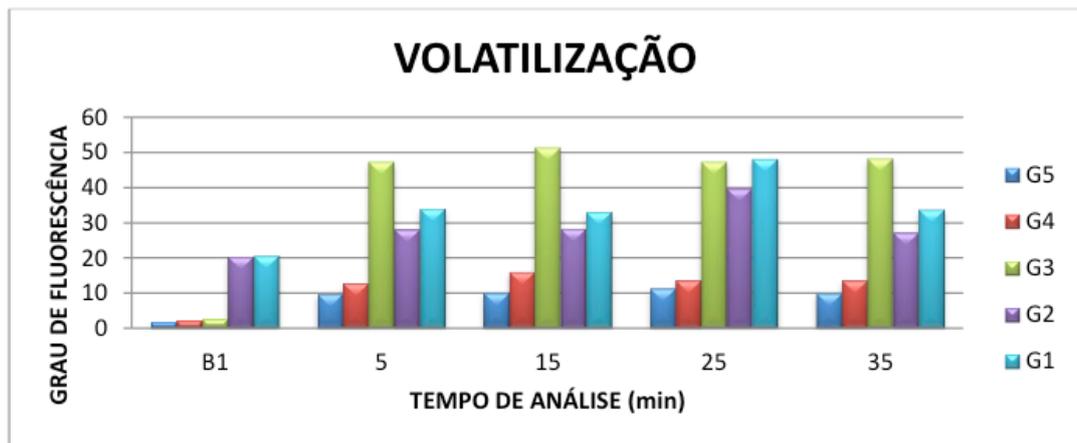


Gráfico 7: Avaliação da volatilização do formol, sendo o grupo G1: formol aquoso 10%; grupo G2: formol em gel 10%; grupo G3: formol em gel 15%; grupo G4: álcool em gel 70% grupo G5: glicerinação.

## DISCUSSÃO

A difusão do formol em contato direto com o tecido é rápida, mas a penetração mais profunda está diretamente relacionada com a temperatura, osmolaridade da solução e espessura da peça. Isso porque há uma reação com as proteínas da parte externa, que diminui o influxo de formol para o interior do tecido à medida que o tempo passa (ROLLS, 2012). Tendo como proposta a repetição da rotina laboral da Seção de Anatomia Animal, todas as peças foram inicialmente fixadas, por imersão, em solução aquosa de formol 10%, independente do tipo de tecido: compacto (rim), cavitário (estômago) e aerado (pulmão).

Não existe solução fixadora ideal o grande objetivo da fixação é prevenir a autólise, prevenir a ação bacteriana, manter o tecido o mais próximo do real e preservar moléculas de interesse do estudo. Neste sentido a fixação pode apresentar os seguintes efeitos sobre os tecidos: endurecimento, solidificação, diferenciação óptica, efeitos de coloração, perda discreta da amostra e retração da amostra.

A técnica de glicerinação utilizada foi capaz de promover uma diminuição nas dimensões das estruturas anatômicas (massa, comprimento e largura) de todas as vísceras avaliadas. Esses resultados corroboraram com os achados de Carvalho et al., 2013, que também relataram a manutenção da morfologia das peças conservadas em glicerina loira. Apesar de observamos uma redução considerável nas massas das diferentes vísceras tratadas pela técnica de glicerinação modificada, o referido fato não interferiu na visualização das estruturas anatômicas inerentes a cada víscera. Segundo Monteiro (1960) e Silva et al. (2008) a glicerina reduz a massa dos órgãos facilitando o seu manuseio, o que pode ser considerado uma vantagem frente as peças que são conservadas em solução aquosa de formol 10%. Sendo assim, a glicerina loira (semipurificada), utilizada em nosso estudo, atendeu

às exigências de uma solução conservadora capaz de preservar a morfologia das peças anatômicas.

A glicerina loira formada no processo do biodiesel é um produto de baixo custo, considerada viável para ser utilizada na técnica de glicerinação e, além disso, corresponde a um meio menos tóxico na conservação de peças anatômicas. (CARVALHO et al., 2013) . De acordo com Monteiro (1960), a glicerinação ou técnica de Giacomini permite uma melhor preservação com as vantagens de peças anatômicas mais leves; esteticamente melhores; conservação média das peças semelhantes a da formalização; baixo custo e facilidade no manuseio das mesmas (SILVA et al., 2008).

As peças conservadas em álcool em gel 70% obtiveram resultados diferenciados, apesar das mesmas terem mantido suas características morfológicas, a consistência friável do rim se mostrou indesejável, já que a peça fica muito sensível ao toque, o que dificulta sua utilização nas aulas práticas. O bom resultado obtido nos pulmões e estômagos faz com que este conservante seja um possível substituto para o formol.

As peças conservadas em formol em gel obtiveram excelentes resultados de conservação em comparação com o grupo controle.

O grupo G2 apresentou um nível de volatilização menor que o grupo controle, o que o faz ser um possível substituto do formol, porém ainda havendo a necessidade de maiores estudos, objetivando principalmente a biossegurança laboral, para discentes e docentes.

## CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível concluir que a glicerinação é uma técnica eficiente e menos tóxica, apesar de possuir um custo elevado, mesmo sendo esta realizada com a glicerina loira, porém, seu custo benefício é melhor do que as outras técnicas testadas, já que as peças glicerinas não necessitam de manutenção, além de otimizarem o espaço do laboratório.

O álcool em gel 70% também se mostrou vantajoso quanto a um meio conservante, obteve um bom resultado de conservação, com excesso dos rins, pois as peças apresentaram uma consistência friável, susceptível à rachadura. Assim como a técnica de glicerinação modificada, seu índice de volatilização foi baixo, porém o custo da solução é alto, com isso vê-se a necessidade e maiores estudos sobre esse possível meio conservante.

Apesar dos potenciais de riscos a saúde e a poluição ambiental causada pelo seu descarte, o formol ainda é o conservante mais utilizado, devido seu baixo custo, a rapidez com que age nos tecidos e por a sua fácil obtenção. Em

sua forma gelificada, o formol 10% apresentou excelentes resultados no que diz respeito à conservação de peças anatômicas, na avaliação de volatilização obteve o resultado esperado e já descrito por Araújo (2009), porém ainda há a necessidade de maiores estudos quanto a volatilização desta solução. Sendo assim objetivamos uma continuação desse estudo afim de encontrarmos uma solução conservadora ou alguma técnica diferente a glicerinação, que conserve de modo satisfatório as peças anatômicas, que possua um custo benefício viável e que ao mesmo tempo priorize a biossegurança dos profissionais nos laboratórios de anatomia.

## REFERÊNCIAS

ALVES, A. **Análises histopatológicas**: porque demoram os resultados. In: Congresso de Ciências veterinárias, 2002. p. 239-47.

ARAÚJO, S. B. **Desenvolvimento e teste da formalina-gel para fixação de pequenas biópsias: uma alternativa biossegura**. Recife. 2009.

CARVALHO, Y. K.; ZAVARIZE K.C; MEDEIROS, L. S. & BOMBONATO, P.P. 2013. **Avaliação do uso da glicerina proveniente da produção de biodiesel na conservação de peças anatômicas**. Pesq. Vet. Bras. 33(1):115-118.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 2006. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Vol.88: Formaldehyde, 2-butoxyethanol, and 1-tert-butoxypropan-2-ol. Lyon, France.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Formol ou formaldeído: Banco de Dados**.2009 Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 10 de junho de 2015

KRUG, L.; PAPPEN, F.; ZIMERMANN, F.; DEZEN, D.; RAUBER, L.; SEMMELMANN, C.; ROMAN, L.I.; BARRETA, M.H. **Conservação de peças anatômicas com glicerina loira**. Concórdia – SC. Instituto Federal Catarinense, 2011.

MONTEIRO, A. U. 1960. **Montagem de parasitas, artrópodes e peças anatômicas em meio sólido**.Revista Inst. Med. Trop. São Paulo, 2:121-124.

PINHEIRO, H. I. C; JESUS, D. S; CRUZ, F. **Importância do monitoramento do formaldeído em ambientes hospitalares utilizando o reagente Fluoral “P” e detecção espectrofluorimétrica**. Anais do I Congresso Nacional da Abdeh – IV Seminário de Engenharia Clínica – 2004.

RODRIGUES, H. **Técnicas Anatômicas**. 1998.

ROLLS, G. **The process of fixation and the nature of fixatives**. Leica Biosystems. Manual, 2012.

SILVA, E.M., et al.; **Estudo analítico da técnica de glicerinação empregada para conservação de peças anatômicas**. Cadernos UniFOA, Volta Redonda, ano 3, Edição Especial, maio 2008

VERONEZ, D. A. L., FARIAS, E. L. P., FRAGA, R., PETERSEN, M. L., SILVEIRA, J.R. P. **Potencial de risco para a saúde ocupacional de docentes, pesquisadores e técnicos de anatomia expostos ao formaldeído**. Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente, v. 5, n. 2, p. 1-14, 2010.

## CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS DE CODORNAS JAPONESAS EM POSTURA SUPLEMENTADAS COM 1,25-DIHIIDROXIVITAMINA-D<sub>3</sub>-GLICOSÍDEO DE ORIGEM VEGETAL

### **Christiane Silva Souza**

Pós-Doutoranda em Zootecnia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica-RJ, Brasil. \*Autora para correspondência: christianessouza@gmail.com

### **Maria Goreti de Almeida Oliveira**

Docente do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa-MG, Brasil.

### **Sérgio Luiz de Toledo Barreto**

Docente do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa-MG, Brasil.

### **Flávio Medeiros Vieites**

Docente de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, Juiz de Fora-MG, Brasil

### **Arele Arlindo Calderano**

Docente do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa-MG, Brasil.

**RESUMO:** Objetivou-se avaliar as características ósseas de codornas japonesas alimentadas com ração suplementada com 1,25-dihidroxivitamina-D<sub>3</sub>-glicosídeo (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) de origem vegetal. Foi utilizado delineamento em blocos casualizados, com cinco tratamentos (0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/kg de ração), seis repetições

e seis aves por unidade experimental. Verificou-se que a composição orgânica (proteínas colagenosas e totais) e a resistência à quebra (RQ) dos ossos de codornas japonesas com 47 semanas de idade alteraram-se com o 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> adicional (p<0,05). A RQ das tíbias direitas das aves que receberam ração suplementada com 0,50µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> foi 20% maior quando comparada com os demais tratamentos. Pode-se inferir que não houve modificação da qualidade óssea das aves, uma vez que a composição mineral – cinzas, cálcio (Ca), fósforo (P), relação Ca:P, a densidade óssea e os teores de proteínas não colagenosas não se modificaram.

**PALAVRAS-CHAVE:** colágeno, colecalciferol, proteína óssea

### BONE CHARACTERISTICS OF JAPANESE LAYING QUAILS SUPPLEMENTED WITH 1,25-DIHYDROXYVITAMIN-D<sub>3</sub>-GLYCOSIDE OF PLANT ORIGIN

**ABSTRACT:** The objective was to evaluate the bone characteristics of Japanese laying quails supplemented with 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-glycoside (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) of plant origin in feed. It was used a randomized block design, with

five treatments (0.0; 0.25; 0.50; 0.75 and 1.00  $\mu\text{g}$   $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ / kg diet), six replicates and six birds each. It was found that the organic composition (collagenous and total proteins) and bone strength (BS) of the bones of Japanese laying quails with 47 weeks of age modified with  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  additional ( $p < 0.05$ ). The BS of the right tibia of the birds fed with dietary supplementation with 0.50  $\mu\text{g}$  of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  was 20% higher when compared with the other treatments. It may be point out that there was no change in bone quality of the birds, since the mineral composition – ash, calcium (Ca), phosphorus (P), Ca:P ratio, the bone density and the levels of non collagenous proteins not modified.

**KEYWORDS:** bone protein, cholecalciferol, collagen

## 1 | INTRODUÇÃO

A vitamina D regula a fisiologia osteomineral, em especial o metabolismo do cálcio (Ca) e fósforo (P). Ela é responsável por estimular a reabsorção destes minerais nos ossos e a sua absorção a nível intestinal (CASTRO, 2011; CARVALHO & FERNANDES, 2013).

Existem alguns compostos, com atividade metabólica de vitamina D. Dentre estes, os que apresentam maior atividade referem-se aos de origem animal, colecalciferol (vitamina  $\text{D}_3$ ), seguidos pelo ergocalciferol (vitamina  $\text{D}_2$ ), de origem vegetal (PEIXOTO et al., 2012).

Os metabólitos hidroxilados da vitamina  $\text{D}_3$  já foram identificados em inúmeras plantas, principalmente as pertencentes a família *Solanaceae* (Jäpelt & Jakobsen, 2013). A *Solanum glaucophyllum* (SG) apresenta em sua composição 54,3% de carboidratos, 24,9% de proteínas, 4,1% de água, 17,1% de minerais (Bachmann et al., 2013) e glicosídeos de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (8,6 a 100 mg/g de folhas secas). A distribuição molecular dos radicais glicosilados na SG é de uma a 12 unidades de hexoses por aglicona (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA, 2015).

As formas  $\text{D}_2$  e  $\text{D}_3$  apresentam atividades biológicas essencialmente idênticas, contudo, espécies aviárias utilizam mais eficientemente a  $\text{D}_3$ . Presumivelmente, tal discriminação seja resultado da ligação reduzida dos metabólitos da vitamina  $\text{D}_2$  às proteínas ligadoras da vitamina D no sangue, levando a depuração mais rápida dos metabólitos da  $\text{D}_2$  no plasma (Bar, 2008; Souza & Vieites, 2014). A vitamina  $\text{D}_3$  é cerca de 30 a 40 vezes mais potente que a  $\text{D}_2$  para aves (PIZAURO JR. et al., 2002).

A estrutura química entre as duas formas da vitamina D diferem apenas quanto ao tamanho das cadeias e formam-se no organismo animal mediante ação da radiação ultravioleta sobre os esteróides, ergosteróis e 7-deidrocolesterol (Guerra et al., 2014). Para ser metabolicamente ativa, a vitamina  $\text{D}_3$  sofre transformações

que ocorrem no fígado e rins, através de reações de adição de grupos de hidroxilas na molécula; produzindo o 25-hidroxicolecalciferol –  $25(\text{OH})\text{D}_3$  e o 1,25 dihidroxicolecalciferol –  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , respectivamente (Hewison, 2011). De maneira geral, as bioatividades das formas da vitamina D seguem a sequência:  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 > 1\alpha(\text{OH})\text{D}_3 > 25(\text{OH})\text{D}_3 > \text{D}_3 > \text{D}_2$  (HAN et al., 2012).

Em criações comerciais, as aves de postura, permanecem em sistema de confinamento, portanto a conversão de 7-deidrocolesterol não assegura fonte suficiente de colecalciferol para as poedeiras. Assim, a suplementação de vitamina  $\text{D}_3$  nas rações torna-se imprescindível (Rodrigues et al., 2005). Outro fato, que deve ser considerado refere-se à progressiva diminuição na habilidade do fígado em hidroxilar a vitamina  $\text{D}_3$  em  $25(\text{OH})\text{D}_3$  com o avançar da idade (Carvalho & Fernandes, 2013), resultando em inadequada produção de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

Nos ossos, o  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  atua no desenvolvimento da placa de crescimento, formação, reabsorção e remodelagem. Ainda, age em sinergismo com o paratormônio, mobilizando Ca e P, mediante indução de diferenciação de células precursoras em osteoclastos; nos osteoblastos maduros, aumentando a expressão da fosfatase alcalina, e de proteínas não colagenosas – osteocalcina e osteopontina (Moreira et al., 2004; Menezes Filho et al., 2008; Dantas et al., 2009; Marques et al., 2010) e na inibição da síntese de colágeno tipo I (CASTRO, 2011).

Desta forma, objetivou-se avaliar a resistência à quebra e a composição orgânica e mineral de tíbias e fêmures de codornas japonesas em postura alimentadas com rações contendo suplemento de 1,25-dihidroxitamina- $\text{D}_3$ -glicosídeo de origem vegetal.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, com duração de 63 dias (três períodos de 21 dias). O projeto obteve Registro no Comitê de Ética para Uso de Animais de Produção – CEUAP, DZO/UFV - n.º.: 82/2013.

Foram utilizadas 180 codornas (*Coturnix coturnix japonica*), de 36 a 45 semanas de idade. O delineamento experimental foi em Blocos Casualizados (DBC), sendo cinco tratamentos (0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00  $\mu\text{g}$  de 1,25-dihidroxitamina  $\text{D}_3$  ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ )/kg de ração); com seis repetições de seis aves por unidade experimental. O critério usado para a formação dos blocos foi o peso das aves (leves e pesadas). A densidade animal por unidade experimental foi de 141,66  $\text{cm}^2$ /ave.

As rações foram formuladas seguindo-se as recomendações de Rostagno et

al., (2011). O produto comercial utilizado como fonte da vitamina D<sub>3</sub> ativa (10 ppm de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/kg), de origem vegetal – *Solanum glaucophyllum*, foi incluso nas rações em substituição ao material inerte (areia), **Tabela 1**.

O fornecimento de luz foi de 17 horas diárias, sendo controlado por um relógio automático (*timer*), que permitiu o acender e o apagar das luzes durante o período da noite, conforme o procedimento adotado em granjas comerciais.

Ingredientes (kg)	Tratamentos ( $\mu\text{g}$ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> /kg de ração)				
	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00
Milho	56,990	56,990	56,990	56,990	56,990
Farelo de soja	32,553	32,553	32,553	32,553	32,553
Óleo de soja	1,274	1,274	1,274	1,274	1,274
Calcário	6,802	6,802	6,802	6,802	6,802
Fosfato bicálcico	1,071	1,071	1,071	1,071	1,071
Sal	0,323	0,323	0,323	0,323	0,323
Lisina-HCl	0,193	0,193	0,193	0,193	0,193
DL-metionina	0,372	0,372	0,372	0,372	0,372
L-triptofano	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013
L-arginina	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049
Premix vitamínico <sup>1</sup>	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix mineral <sup>2</sup>	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Cloreto de colina	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Antioxidante <sup>3</sup>	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
<b>Fonte de 1,25-dihidroxitamina-D<sub>3</sub><sup>4</sup></b>	<b>0,000</b>	<b>0,0025</b>	<b>0,005</b>	<b>0,0075</b>	<b>0,010</b>
Inerte <sup>5</sup>	0,100	0,098	0,095	0,093	0,090
Total (kg)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
<b>Composição Calculada</b>					
Proteína bruta (%)	19,70	19,70	19,70	19,70	19,70
Energia metabolizável (kcal/kg)	2800	2800	2800	2800	2800
Cálcio	2,922	2,922	2,922	2,922	2,922
Fósforo disponível (%)	0,304	0,304	0,304	0,304	0,304
Sódio (%)	0,146	0,146	0,146	0,146	0,146
Lisina digestível (%)	1,097	1,097	1,097	1,097	1,097
Metionina+ Cistina digestível (%)	0,900	0,900	0,900	0,900	0,900
Treonina digestível (%)	0,665	0,665	0,665	0,665	0,665
Triptofano digestível (%)	0,230	0,230	0,230	0,230	0,230
Arginina digestível (%)	1,273	1,273	1,273	1,273	1,273
Valina digestível (%)	0,829	0,829	0,829	0,829	0,829
Isoleucina digestível (%)	0,762	0,762	0,762	0,762	0,762
Glicina+ Serina digestível (%)	1,634	1,619	1,619	1,619	1,634
Leucina digestível (%)	1,537	1,537	1,537	1,537	1,537
Ácido linoleico (%)	2,048	2,048	2,048	2,048	2,048
Fibra bruta (%)	2,711	2,711	2,711	2,711	2,711

Tabela 1. Composição das rações experimentais, na matéria natural

<sup>1</sup>Composição/kg de produto: Vit. A: 12.000.000 U.I., Vit. D<sub>3</sub>: 3.600.000 U.I., Vit. E: 3.500 U.I., Ácido nicotínico: 40.000 mg, Ácido pantotênico: 12.000 mg, Vit. B<sub>12</sub>: 20.000 mg, Vit. B<sub>2</sub>: 8.000 mg, Vit. B<sub>6</sub>: 5.000 mg, Vit. K: 3.000

mg, Vit. B<sub>1</sub>: 2.500 mg, Ácido fólico: 1.500mg, Biotina: 200 mg, Veículo q.s.p.: 1.000 g. <sup>2</sup>Composição/kg de produto: Manganês: 160 g, Ferro: 100 g, Zinco: 100 g, Cobre: 20 g, Cobalto: 2 g, Iodo: 2 g, Selênio: 150 mg, Veículo q.s.p.: 1000 g. <sup>3</sup>Butil-hidróxi-tolueno, 99%. <sup>4</sup>Produto comercial, fonte de vitamina D<sub>3</sub> ativa de origem vegetal – *Solanum glaucophyllum*, contendo 10 ppm de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/kg de produto. <sup>5</sup>Areia

Na 47<sup>a</sup>. semana de idade, uma ave/repetição foi pesada, sacrificada por sangria e tiveram as tíbias (30 pares) e os fêmures (30 pares) removidos. Os ossos foram limpos de todo tecido aderente, identificados e congelados (-20°C). As análises da composição orgânica e mineral dos ossos foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Animal (LBA), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) da UFV.

Nos ossos *in natura*, procedeu-se a retirada de todo tecido aderente, com auxílio de tesouras e pinças, pesagem em balança analítica ( $\pm 0,0001$ g), bem como as mensurações dos diâmetros (horizontal e vertical) e do comprimento (mm) usando paquímetro digital (Mitutoyo® 0-150mm, precisão 0,001mm). Dividindo-se o peso do osso (mg) pelo seu comprimento (mm), foi calculado o Índice de Seedor (SEEDOR et al., 1991).

As tíbias e os fêmures direitos foram usados na determinação da resistência à quebra, sendo descongelados até a temperatura ambiente e, posteriormente, submetidos a um ensaio de flexão, com o uso de uma máquina universal de ensaios mecânicos Contenco, capacidade de 10 T (UMC 100®). Todos os ossos foram testados na mesma posição, com as suas extremidades apoiadas em dois suportes apropriadamente afastados de acordo com o comprimento, sendo a carga aplicada no centro (região da diáfise do osso), seguindo-se especificações da Sociedade Americana de Engenharia Agrícola (ASAE S459, 1998). A distância entre os apoios (vão) utilizada foi de 2,20 cm para os fêmures, 2,53 cm para os tibiotarsos, e a velocidade foi de 2,00 mm/min. O momento da ruptura do osso foi registrado em quilograma força (kgf).

Após a obtenção da resistência, os ossos foram cortados longitudinalmente, sendo removida a medula óssea com jatos de água destilada. Em seguida, foram desengordurados com éter de petróleo, em aparelho *Soxhlet*, por quatro horas, para a determinação das concentrações de proteínas colagenosas (PC) e não colagenosas (PNC), conforme proposto por Barbosa et al., (2010). Os ossos foram desmineralizados com solução de sal dissódico de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para extração de PNC. O fim da extração foi confirmado com ácido oxálico, que permitiu identificar a desmineralização completa. As PNC foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Depois de desengordurados e desmineralizados, os ossos foram lavados exaustivamente com água destilada e deionizada para retirada do EDTA e então usados para determinação de PC, utilizando o método de *Kjedahl* para estimar o

nitrogênio total (NT). O teor de PC foi obtido, multiplicando-se o NT pelo fator 6,25 (Silva & Queiroz, 2006). Os percentuais das proteínas ósseas foram calculados em relação ao peso seco do osso seco e desengordurado.

Para a determinação do conteúdo mineral, as tíbias e os fêmures esquerdos foram descongelados e submetidos à estufa 105°C por seis horas, e em seguida, desengordurados com éter de petróleo, em aparelho *Soxhlet*, por quatro horas, sendo então obtidos os pesos secos e desengordurados dos ossos. Posteriormente, foram calcinados em mufla a 600°C, por um período de seis horas, para mensuração dos teores de cinzas e posterior preparo de solução mineral (via seca), seguindo-se a metodologia de Silva & Queiroz (2006).

O teor de Ca nas cinzas dos ossos foi determinado por espectrometria de absorção atômica, e o de P por colorimetria. Os valores percentuais dos minerais foram expressos em relação ao peso do osso seco e desengordurado (Barbosa et al., 2010). A relação cálcio:fósforo (Ca:P) foi obtida dividindo-se a percentagem de Ca pela de P nas cinzas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e regressão, considerando o nível de 5,0% de probabilidade. Quando a regressão não foi significativa, optou-se pela aplicação de teste de comparação de médias (Student-Newman-Keuls ou teste t), seguindo as recomendações de Sampaio (2010). As análises foram realizadas utilizando o *software* SISVAR, versão 5.6 (Build 86), de análises estatísticas e planejamento de experimento (FERREIRA, 2014).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pesos *in natura*, comprimentos, diâmetros horizontais e Índice de Seedor das tíbias e fêmures esquerdos das codornas japonesas não foram influenciados pela suplementação com 1,25-dihidroxitamina-D<sub>3</sub> (Tabela 1). Possivelmente as aves foram capazes de metabolizar suficiente 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> a partir do colecalciferol dietético, e/ou utilizar a quantidade adicional do referido metabólito na manutenção óssea.

Variável	Osso	µg 1,25-dihidroxitamina-D <sub>3</sub> / kg de ração					CV (%)
		0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	
Tíbias							
Peso da ave (g) <sup>ns</sup>	-	221,16	222,70	217,32	216,71	218,77	5,31
Peso <i>in natura</i> (g) <sup>ns</sup>	TD	0,83	0,84	0,79	0,84	0,78	13,03
Peso <i>in natura</i> (g) <sup>ns</sup>	TE	0,80	0,81	0,77	0,77	0,78	13,87
Comprimento (mm) <sup>ns</sup>	TD	51,20	50,19	49,84	51,24	50,14	3,13
Comprimento (mm) <sup>ns</sup>	TE	50,91	50,48	49,44	49,45	50,02	4,45
Índice Seedor <sup>ns</sup>	TD	15,88	16,64	15,73	16,51	15,61	11,34
Índice Seedor <sup>ns</sup>	TE	15,78	16,04	16,00	15,83	16,01	10,20

Diâmetro horizontal (mm) <sup>ns</sup>	TD	2,68	2,82	2,65	2,77	2,69	8,03
Diâmetro horizontal (mm) <sup>ns</sup>	TE	2,77	2,78	2,65	2,85	2,75	5,17
Diâmetro vertical (mm) <sup>ns</sup>	TD	2,74	2,93	2,68	2,82	2,69	6,42
Diâmetro vertical (mm) <sup>ns</sup>	TE	2,91	2,92	2,77	3,05	2,94	9,53
Resistência à quebra (kgf) <sup>1*</sup>	TD	3,33 ab	3,50 ab	4,50 a	2,75 b	3,58 ab	30,73
<b>Fêmures</b>							
Peso <i>in natura</i> (g) <sup>ns</sup>	FD	0,74	0,83	0,75	0,63	0,77	20,85
Peso <i>in natura</i> (g) <sup>ns</sup>	FE	0,68	0,80	0,79	0,74	0,71	11,53
Comprimento (mm) <sup>ns</sup>	FD	41,46	41,59	40,54	41,42	41,32	2,67
Comprimento (mm) <sup>ns</sup>	FE	41,04	41,16	41,03	41,50	41,59	3,69
Índice Seedor <sup>ns</sup>	FD	17,81	19,84	18,45	18,31	18,75	10,32
Índice Seedor <sup>ns</sup>	FE	16,51	19,42	19,33	17,91	17,09	10,03
Diâmetro horizontal (mm) <sup>ns</sup>	FD	3,04	3,24	3,00	3,17	3,04	5,29
Diâmetro horizontal (mm) <sup>ns</sup>	FE	3,04	3,15	2,94	3,12	2,91	4,79
Diâmetro vertical (mm)*	FD	2,93 b	3,14 ab	3,01 b	3,25 a	2,94 b	5,20
Diâmetro vertical (mm) *	FE	3,12 ab	3,19 ab	3,09 ab	3,33 a	2,98 b	6,37
Resistência à quebra (kgf) <sup>ns</sup>	FD	2,33	3,17	3,80	2,20	3,40	33,34

Tabela 1. Peso *in natura*, comprimento, diâmetros, Índice Seedor e resistência à quebra dos ossos de codornas japonesas alimentadas com ração contendo 1,25-dihidroxitamina-D<sub>3</sub>-glicosídeo de origem vegetal

TD = tibia direita; TE = tibia esquerda; FD = fêmur direito; FE = fêmur esquerdo; CV = coeficiente de variação; ns = não significativo (p>0,05). <sup>1\*</sup>Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si, pelo Teste t (p>0,05). \*Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si, pelo Teste Student-Newman-Keuls – SNK (p>0,05).

Os diâmetros verticais dos fêmures (direitos e esquerdos) foram alterados com a adição da vitamina D<sub>3</sub> ativa (p<0,05), sendo os maiores valores observados em 0,75 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/kg de ração. A resistência à quebra (RQ) das tíbias direitas foi influenciada com o acréscimo de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nas rações (p<0,05). O fornecimento de 0,50 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> mostrou-se a melhor opção, pois aumentou em mais de 20% a RQ, em relação aos demais tratamentos. Frost & Roland (1990) também verificaram aumento na RQ de tíbias de poedeiras Hy-line W36, com 65 semanas de idade, alimentadas com suplemento de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (0,0, 0,5 e 1,0 µg) nas rações.

Os resultados para RQ observados neste estudo estão de acordo com os descritos por Bachmann et al. (2013), que estudaram a adição de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> proveniente de folhas secas de *Solanum glaucophyllum* – SG (10 µg), de extratos purificados (9,50 µg e 37,90 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), e do metabólito de origem sintética (5,0 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) nas rações para frangos de corte. Os pesquisadores relataram que a resistência à ruptura, bem como a rigidez das tíbias, foram maiores para os tratamentos com adição do metabólito, quando comparado ao controle. As folhas de SG apresentaram valores semelhantes àqueles com uso de vitamina D<sub>3</sub> sintética.

O Índice de Seedor (IS) é utilizado como indicativo da densidade óssea, de

modo que, quanto maior esse índice, maior a densidade da peça e vice-versa. Não foram constatadas quaisquer alterações nos valores de IS dos ossos estudados, tais resultados indicam a integridade no preenchimento da matriz orgânica óssea. Rivera et al., (2014) estudaram diferentes combinações de níveis de Ca e P e suplemento de vitamina D<sub>3</sub> e 25(OH)D<sub>3</sub> para poedeiras leves de 24 a 40 semanas de idade. Os autores relataram maior densitometria radiográfica nas tíbias das aves alimentadas com 3,8% de Ca, 0,36% P e adição de 25(OH)D<sub>3</sub>, como fonte isolada da vitamina D.

Os pesos secos e desengordurados (PSD), bem como os valores de proteínas não colagenosas (PNC) dos ossos avaliados não foram alterados em função do incremento dietético de vitamina D<sub>3</sub> ativa (Tabela 2). Ao contrário do observado para a fração insolúvel em EDTA (PC) e quantidade de proteínas ósseas totais – PT (p<0,05).

Nas tíbias, os menores percentuais de PC e PT foram observados no fornecimento de 0,50 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/kg de ração, de modo similar ao observado nos fêmures.

A osteocalcina representa 10 a 20% do total das PNC, e sua síntese é aumentada pelo 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Avolio et al., 2008; Araújo et al., 2012). Entretanto, isso não foi verificado, indicando que não houve desequilíbrio metabólico a ponto de interferir nessa variável nas condições avaliadas. As PNC contribuem para uma variedade de funções no osso, tais como a estabilização da matriz, calcificação e outras atividades regulatórias do metabolismo. As Gla-proteínas, que compõem parte das PNC podem inibir a mineralização óssea ou estimular a ação dos osteoclastos (Araújo et al., 2011).

Variável	Osso	µg 1,25-dihidroxitamina-D <sub>3</sub> / kg de ração					CV (%)
		0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	
<b>Tíbias</b>							
PSD <sup>1</sup> (g) <sup>ns</sup>	TD	0,42	0,46	0,49	0,41	0,44	17,24
PNC <sup>2</sup> (%) <sup>ns</sup>	TD	0,53	0,45	0,53	0,57	0,48	14,27
PC <sup>3</sup> (%) <sup>*</sup>	TD	24,02 a	22,51 ab	20,37 b	22,81 ab	22,19 ab	8,94
PT <sup>4</sup> (%) <sup>*</sup>	TD	24,55 a	22,96 ab	20,90 b	23,38 ab	22,67 ab	8,71
<b>Fêmures</b>							
PSD <sup>1</sup> (g) <sup>ns</sup>	FD	0,36	0,41	0,45	0,37	0,42	16,86
PNC <sup>2</sup> (%) <sup>ns</sup>	FD	0,61	0,52	0,48	0,59	0,51	23,70
PC <sup>3</sup> (%) <sup>*</sup>	FD	25,98 a	22,53 ab	19,39 b	24,93 a	24,09 a	11,29
PT <sup>4</sup> (%) <sup>*</sup>	FD	26,59 a	23,05 ab	19,87 b	25,52 a	24,60 a	11,35

Tabela 2. Peso seco e desengordurado, percentuais de proteínas não colagenosas, colagenosas e totais nos ossos codornas japonesas em postura alimentadas com ração contendo 1,25-dihidroxitamina-D<sub>3</sub>-glicosídeo de origem vegetal

<sup>1</sup>PSD = peso seco e desengordurado; <sup>2</sup>PNC = proteínas não colagenosas; <sup>3</sup>PC = proteínas colagenosas; <sup>4</sup>PT = proteínas totais; TD = tibia direita; FD = fêmur direito; CV = coeficiente de variação; ns = não significativo (p>0,05). \*Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si, pelo Teste Student-Newman-Keuls – SNK (p>0,05).

No que se refere ao conteúdo mineral, as quantidades de Ca, P e a relação Ca:P nos ossos das codornas japonesas não foram influenciados pelo suplemento de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Tabela 3). Os resultados da composição inorgânica corroboram com os observados para PNC, denotando não modificação da matriz óssea.

Variável Tíbias	Osso	µg 1,25-dihidroxitamina-D <sub>3</sub> / kg de ração					CV (%)
		0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	
PSD <sup>1</sup> (g) <sup>ns</sup>	TE	0,42	0,44	0,44	0,39	0,44	14,75
Cinzas (g) <sup>ns</sup>	TE	0,1794	0,1869	0,1734	0,1666	0,1805	14,14
Cinzas (%) <sup>ns</sup>	TE	43,29	42,13	39,42	42,62	41,63	6,87
Cálcio (%) <sup>ns</sup>	TE	33,30	37,98	34,98	34,66	29,44	15,73
Fósforo (%) <sup>ns</sup>	TE	14,29	15,34	14,78	14,90	12,22	12,83
Ca:P <sup>ns</sup>	TE	2,33	2,47	2,34	2,33	2,40	7,54
<b>Fêmures</b>							
PSD <sup>1</sup> (g) <sup>ns</sup>	FE	0,34	0,38	0,45	0,34	0,39	23,18
Cinzas (g) <sup>ns</sup>	FE	0,1504	0,1536	0,1710	0,1406	0,1500	16,85
Cinzas (%) <sup>ns</sup>	FE	43,71	42,40	38,26	42,02	39,57	9,79

Tabela 3. Conteúdo mineral nos ossos de codornas japonesas em postura alimentadas com ração contendo 1,25-dihidroxitamina-D<sub>3</sub>-glicosídeo de origem vegetal

<sup>1</sup>PSD = peso seco e desengordurado; TE = tíbia esquerda; FE = fêmur esquerdo; CV = coeficiente de variação; ns = não significativo (p>0,05). \*Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si, pelo Teste Student-Newman-Keuls – SNK (p>0,05).

As relações Ca:P observadas nesse experimento foram próximas da relatada por Thorp & Waddington (1997) e Field (2000) como ótima para normal mineralização dos ossos, de 2:1. De acordo com Han et al., (2015) o metabolismo da vitamina D influencia-se pelas quantidades de Ca e P nas dietas. Sheikhlar & Navid (2009) investigaram as características ósseas de codornas de corte até três semanas de idade, que receberam dietas com adição de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e deficientes em Ca (0,71%) e P<sub>disp</sub> (0,37%) e constataram que 6,5 µg do metabólito aumentou a concentração de cinzas e Ca nos ossos das aves.

Embora os valores de Ca (2,92%) e P<sub>disp</sub> (0,30%) ofertados nas rações estarem em conformidade com o preconizado para o atendimento das exigências dessas aves, não foi verificada alteração nos valores das cinzas e minerais, em função do fornecimento adicional do 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Desse modo, pode-se inferir que o máximo valor suplementar (1,0 µg) não foi suficiente para promover maior retenção mineral.

#### 4 | CONCLUSÕES

A composição orgânica (PC e PT) e a resistência à quebra dos ossos de codornas japonesas com 47 semanas de idade alteraram-se com o suplemento de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glicosídeo de origem vegetal. Entretanto, não houve modificação

da qualidade óssea das aves, uma vez que a composição mineral (cinzas, Ca e P, Ca:P), a densidade (IS) e as frações solúveis em EDTA (PNC) não se modificaram.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS. **ASAE Standard S459. Shear and three-point bending test of animal bone**. Saint Joseph: ASAE, p. 581-583, 1998.

ARAÚJO, G. M.; VIEITES, F. M.; BARBOSA, A. A. et al. Variação aniônica da dieta sobre características ósseas de frangos de corte: resistência à quebra, composição orgânica e mineral. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.954-961, 2011.

ARAÚJO, G. M.; VIEITES, F. M.; SOUZA, C. S. Importância do desenvolvimento ósseo na avicultura. **Archivos de Zootecnia**, v.61(R), p.79-89, 2012.

AVOLIO, G.; BRANDÃO, C. M. A.; OLIVEIRA, J. X. et al. O papel da vitamina D<sub>3</sub> e da osteocalcina no metabolismo ósseo: uma análise necessária para se otimizar a osseointegração. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.26, n.3, p.347-350, 2008.

BACHMANN, H.; OFFORD-CAVIN, E.; PHOTHIRATH, P. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-glycoside of herbal origin exhibits delayed release pharmacokinetics when compared to its synthetic counterpart. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.136, p. 333-336, 2013.

BAR, A. Calcium homeostasis and vitamin D metabolism and expression in strongly calcifying laying birds. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.151, p.477-490, 2008.

BARBOSA, A. A.; MORAES, G. H. K.; TORRES, R. A. et al. Avaliação da qualidade óssea mediante parâmetros morfométricos, bioquímicos e biomecânicos em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.4, p.772-778, 2010.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.2, p.248-254, 1976.

CARVALHO, L. S. S.; FERNANDES, E. A. Formação da casca de ovos de reprodutoras e poedeiras comerciais. **Medicina Veterinária**, v.7, n.1, p.25-44, 2013.

CASTRO, L. C. G. O sistema endócrino e a vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.55, n.8, p.566-575, 2011.

DANTAS, A. T.; DUARTE, A. L. B.; MARQUES, C. D. L. A vitamina D na artrite reumatoide e no lúpus eritematoso. **Temas de Reumatologia Clínica**, v.10, n.2, p.53-59, 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific Opinion on the safety of *Solanum glaucophyllum* standardised leaves as feed material. **EFSA Journal**, v.13, n.1, p.3967, 2015.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência & Agrotecnologia**, v.38, n.2, p.109-112, 2014.

FIELD, R. A. Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures. **Meat Science**, v.55, n.3, p.255-264, 2000.

FROST, T. J.; ROLAND, D.A. Influence of vitamin D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on eggshell quality, tibia strength, and various production parameters in commercial laying hens. **Poultry Science**, v.69, p.2008-2016, 1990.

- GUERRA, A. F. Q. G.; MURAKAMI, A. E.; SANTOS, T. C. et al. Utilização da vitamina D<sub>3</sub> e seus metabólitos na alimentação de frangos de corte sobre parâmetros imunológicos e morfometria intestinal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.5, p.477-484, 2014.
- HAN, J.; LIU, Y.; YAO, J. et al. Dietary calcium levels reduce the efficacy of one alpha-hydroxycholecalciferol in phosphorus-deficient diets of broilers. **Journal of Poultry Science**, v.49, p.34-38, 2012.
- HAN, J. C.; MA, K.; WANG, J. G. et al. Effects of non-phytate phosphorus and 1 $\alpha$ -Hydroxycholecalciferol on growth performance, bone mineralization, and carcass traits of broiler chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.17, n.4, p.503-510, 2015.
- HEWISON, M. Vitamin D and immune function: an overview. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.71, p.50-61, 2011.
- JÄPELT, R. B.; JAKOBSEN, J. Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. **Frontiers in Plant Science**, v.4, 2013. DOI: 10.3389/fpls.2013. 00136.
- MARQUES, C. D. L.; DANTAS, A. T.; FRAGOSO, T. S. et al. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.1, p.67-80, 2010.
- MENEZES FILHO, H. C.; SETIAN, N.; DAMIANI, D. Raquitismo e metabolismo ósseo. **Pediatria**, v.30, n.1, p.41-55, 2008.
- MOREIRA, R. O.; DUARTE, M. L. F.; FARIAS, M. L. F. Distúrbios do eixo cálcio-PTH-vitamina D nas doenças hepáticas crônicas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.48, n.4, p.443-450, 2004.
- PEIXOTO, P. V.; KLEM, M. A. P.; FRANÇA, T. N. et al. Hipervitaminose D em animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.7, p.573-594, 2012.
- PIZAURO JUNIOR, J. M.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4, n.3, p.169-185, 2002.
- RIVERA, D. F. R.; BERTECHINI, A. G.; OLIVEIRA, T. F. B. et al. Combinations of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol as vitamin D sources in white laying hen feed diets. **Ciência & Agrotecnologia**, v.38, n.6, p.573-580, 2014.
- RODRIGUES, E. A.; JUNQUEIRA, O. M.; CANCHERINI, L. C. et al. Desempenho e qualidade da casca para poedeiras recebendo vitamina D nas rações pré-postura e postura. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.27, n.1, p.55-59, 2005.
- ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3.ed. Viçosa-MG: UFV/DZO, 2011. 252p.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3.ed. Belo Horizonte-MG: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010. 264p.
- SEEDOR, J. G.; QUARRACCIO, H. H.; THOMPSON, D. D. The biophosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Bone and Mineral Research**, v.6, p.339-346, 1991.
- SHEIKHLAR, A. NAVID, S. Effect of dietary 1,25-dihydroxycholecalciferol concentration on growth performance and bone characteristics of Japanese quail fed diet deficient in calcium and phosphorus. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.8, n.10, p.1517-1520, 2009.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 235p.

SOUZA, C. S.; VIEITES, F. M. Vitamin D<sub>3</sub> e seus metabólitos para frangos de corte. **Archivos de Zootecnia**, v.63(R), p.11-24, 2014.

THORP, B. H.; WADDINGTON, D. Relationships between the bone pathologies, ash and mineral content of long bones in 35-day-old broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, v.62, p.67-73, 1997.

## IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA RAÇA GIROLANDO NO ESTADO DO AMAZONAS

**Léo Fernando de Faria Salgado**

Universidade Brasil, Programa de Pós-Graduação em Produção Animal, Descalvado – São Paulo

**RESUMO:** Os objetivos do estudo consistiram em identificar a frequência dos grupos genéticos e caracterizar o fenótipo do grupo genético  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir da raça Girolando em Rebanhos Não Certificados (RNC) realizando análises comparativas em relação aos Rebanhos Certificados (RC) pela Associação Brasileira dos Criadores de Girolando no Estado do Amazonas. Os dados foram obtidos a partir de análises de relatórios de genealogia dos RC e de avaliações visuais morfológicas nos RNC. Nos RC constatou-se uma frequência maior dos grupos genéticos  $\frac{3}{4}$  Holandês +  $\frac{1}{4}$  Gir e  $\frac{7}{8}$  Holandês +  $\frac{1}{8}$  Gir em relação aos RNC, apresentando um percentual maior do grupo genético  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir em relação aos RC. As médias, desvios-padrão e coeficientes de variação para as características avaliadas nos RC foram:  $27,45 \pm 1,77$  (6,4%),  $16,26 \pm 1,22$  (7,5%),  $24,58 \pm 2,4$  (10,3%),  $12,49 \pm 0,88$  (7,0%), apresentando superiores e com uma menor variação em relação às características dos RNC. O grupo genético  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir dos RC obteve 60,52% nas classificações de tipo

BOM, BOM PARA + e MUITO BOM e 11,58% na classificação REGULAR. Ao contrário dos RNC que obteve 19,81% nas classificações BOM, BOM PARA + e MUITO BOM e 43,25% na classificação REGULAR. Verificou-se que a diversidade de grupos genéticos dificulta a implantação dos manejos nutricional e sanitário e o grupo genético  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir dos RC foram melhores caracterizados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fenótipo, Melhoramento animal, Grupo genético.

### IDENTIFICATION OF GENETIC COMPOSITION AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF THE GIROLANDO RACE IN THE STATE OF AMAZONAS

**ABSTRACT:** The objectives of the study were to identify the frequency of genetic groups and to characterize the phenotype of the genetic group  $\frac{1}{2}$  Dutch +  $\frac{1}{2}$  Gir of the Girolando breed in Non Certified Herds (RNC) performing comparative analyzes in relation to Certified Herds (RC) by the Brazilian Association of Breeders Of Girolando in the State of Amazonas. Data were obtained from analyzes of RC genealogy reports and morphological visual evaluations in RNC. In the RC, a higher frequency of the genetic groups  $\frac{3}{4}$  Dutch +  $\frac{1}{4}$  Gir and  $\frac{7}{8}$  Dutch +  $\frac{1}{8}$  Gir in relation to

the RNC was observed, presenting a higher percentage of the genetic group  $\frac{1}{2}$  Dutch +  $\frac{1}{2}$  Gir in relation to CR. The means, standard deviations and coefficients of variation for the characteristics evaluated in CR were:  $27.45 \pm 1.77$  (6.4%),  $16.26 \pm 1.22$  (7.5%),  $24.58 \pm 2.4$  (10.3%),  $12.49 \pm 0.88$  (7.0%), presenting higher and with a lower variation in relation to the RNC characteristics. The genetic group  $\frac{1}{2}$  Dutch +  $\frac{1}{2}$  Gir of the RC obtained 60,52% in the classifications of type GOOD, GOOD FOR + and VERY GOOD and 11,58% in the REGULAR classification. Unlike the RNC that obtained 19.81% in the GOOD, GOOD FOR + and VERY GOOD ratings and 43.25% in the REGULAR classification. It was verified that the diversity of genetic groups makes difficult the implantation of nutritional and sanitary management and the genetic group  $\frac{1}{2}$  Dutch +  $\frac{1}{2}$  Gir of RC were better characterized.

**KEYWORDS:** Phenotype; Animal breeding; Genetic group.

## 1 | INTRODUÇÃO

Nos sistemas de produção sob condições tropicais, tem-se utilizado em larga escala o cruzamento de raças zebuínas, que apresentam excelente adaptação às condições tropicais, com raças de origem europeia, especializadas em produção de leite. Isso ocorre, geralmente, em razão de sérios problemas de adaptação dos animais puros de raças especializadas sob condições tropicais, como estresse térmico, baixa qualidade dos alimentos, manejo inadequado, parasitas, entre outros, que, em muitos casos, inviabilizam o sistema de produção (FACÓ et al., 2005). No entanto, os autores destacam que antes da definição dos cruzamentos a ser implementados, é preciso uma análise das condições do ambiente, em especial as econômicas.

Nesse contexto, RUAS et al. (2004) afirmam que para obter produtos e/ou animais com eficiência maior em uma determinada região deve-se levar em consideração o grau de utilização dos recursos genéticos e dos ambientes disponíveis, bem como de possíveis interações entre eles.

O Girolando, raça sintética resultante desta prática, teve sua formação motivada pela busca da conciliação da capacidade produtiva do Holandês com a rusticidade e longevidade do Gir Leiteiro, conhecida por sua versatilidade e diversidade de grupos genéticos:  $\frac{1}{4}$  Holandês +  $\frac{3}{4}$  Gir,  $\frac{3}{8}$  Holandês +  $\frac{5}{8}$  Gir,  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir,  $\frac{5}{8}$  Holandês +  $\frac{3}{8}$  Gir,  $\frac{3}{4}$  Holandês +  $\frac{1}{4}$  Gir,  $\frac{7}{8}$  Holandês +  $\frac{1}{8}$  Gir e o Puro Sintético (bi-mestiço  $\frac{5}{8}$  Holandês +  $\frac{3}{8}$  Gir), o que proporciona ao criador fazer escolhas de acordo com o seu sistema de produção (ABCG, 2014).

A escolha e classificação dos animais domésticos com base na forma e na aparência vêm sendo utilizada pelo homem como ferramenta de seleção a centenas de anos (PEREIRA, 2012).

FILHO et al. (2003) complementam que a avaliação visual empírica pode ser utilizada como preceito na comercialização e descarte dos animais, concessão de registros genealógicos, em julgamentos comparativos nas pistas de exposições agropecuárias e em acasalamentos dirigidos, no qual muitos profissionais analisam o exterior dos animais em complemento com dados de genealogia, desempenho fenotípico e em avaliações genéticas.

O fenótipo, isto é, a expressão de características dos indivíduos é resultado do patrimônio genético que aquele animal possui o chamado genótipo. A manifestação fenotípica para determinada característica é o resultado da ação do genótipo e do ambiente (BODÓ, 1990; RIBEIRO, 2004). Entretanto, quando se consideram vários ambientes, pode-se detectar um componente adicional, causado pela interação genótipo x ambiente. Sua avaliação é de grande importância no melhoramento genético, pois ela pode indicar que o melhor genótipo em um ambiente não o ser no outro (CRUZ, REGAZZI, 1994), (CRUZ, REGAZZI, 2001).

Diante dessa realidade existe uma necessidade da utilização de técnicas para identificação dos padrões morfológicos dos grupos genéticos da raça Girolando no sentido de adequar o manejo e a nutrição dos animais de acordo com o nível tecnológico do sistema de produção e sensibilizar quanto à importância de se efetuar avaliações fenotípicas que orientam na obtenção, seleção e cruzamentos gerando subsídios no processo de implantação de programas de melhoramento genético dos animais, principalmente, o grupo genético  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir, que possui características funcionais para um modelo sustentável ao encontro com a realidade regional contribuindo para um avanço importante no caminho do processo produtivo e, conseqüentemente, possibilitando o aumento da renda dos produtores.

Esta pesquisa teve como objetivos identificar a frequência dos diferentes graus de sangue e caracterizar o fenótipo do grupo genético  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir da raça Girolando em sistemas de produção tradicionais com Rebanhos Não Certificados (RNC) realizando análises comparativas em relação aos Rebanhos Certificados (RC) pela Associação Brasileira dos Criadores de Girolando - ABCG no Estado do Amazonas.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em propriedades leiteiras com sistemas de produção tradicionais com Rebanhos Não Certificados (RNC) e Rebanhos Certificados pela Associação Brasileira dos Criadores de Girolando - ABCG no Estado do Amazonas durante o período de agosto a dezembro de 2014.

O presente estudo caracteriza-se pesquisa observacional descritiva de caráter prospectivo, fundamentado em dados primários e secundários.

A pesquisa foi realizada em 12 propriedades com sistemas de produção de leite escolhidos aleatoriamente, sendo seis identificados como Rebanhos Não Certificados (RNC) e seis rebanhos identificados como Rebanhos Certificados (RC). Os animais que participaram da pesquisa foram 936 fêmeas adultas, que estavam em lactação.

Primeiramente, para diferenciação dos grupos genéticos foram utilizadas observações visuais conforme os padrões morfológicos para cada grau de sangue, segundo o Regulamento do Serviço de Registro Genealógico da Raça Girolando.

Paralelamente, para estimar a adaptação dos grupos genéticos aos sistemas de produção dos Rebanhos Não Certificados (RNC) foram feitas observações visuais quanto à ausência de tetas, presença de afecções nos cascos, nível de infestação de carrapatos (baixo, médio, alto) e a condição corporal dos animais determinada pela observação visual da cobertura muscular e de gordura da garupa da vaca através de escores corporais de 1 a 5 (1- vaca muito magra, 2- vaca magra, 3- vaca regular, 4- vaca boa, 5- vaca gorda).

Os seis sistemas de produção dos Rebanhos Não Certificados (RNC) foram enquadrados de acordo com o nível tecnológico do manejo: baixo e médio, sendo os grupos compostos por 4 e 2 rebanhos, respectivamente. Os critérios usados para o enquadramento foram:

1- nível tecnológico alto: sistemas de produção que possuam ordenhadeira mecânica do tipo leite canalizado, altos investimentos em máquinas e implementos agrícolas e instalações sofisticadas;

2- nível tecnológico médio: sistemas de produção que possuam ordenhadeira mecânica do tipo balde ao pé e com médio investimento em máquinas, implementos agrícolas e instalações;

3- nível tecnológico baixo: sistemas de produção que não possuam máquinas, implementos agrícolas e ordenhadeira mecânica e com pequeno investimento em instalações.

Para avaliação fenotípica do grupo genético  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir, foram contempladas na coleta de dados variáveis referentes às seguintes características fenotípicas: Aparência Geral (AG): Feminilidade, cabeça, pescoço, cernelha, dorso e lombo, garupa, cauda, pele e pigmentação – 34 pontos; Capacidade Corporal (CC): tórax, costado, flanco e ventre – 18 pontos; Características Leiteiras (CL): úbere, ligamento anterior, ligamento posterior, piso, tetas e veias mamárias – 34 pontos; Aparelho Reprodutor e Aprumos (AR/A): vulva, membros anteriores e membros posteriores – 14 pontos, para o enquadramento no padrão da Categoria de Cruzamentos sob Controle de Genealogia (CCG), com exigência mínima de 65 pontos, onde foi utilizada uma tabela de pontos para classificação de tipo da raça Girolando.

A Associação Brasileira dos Criadores de Girolando (ABCG) forneceu as informações da frequência dos grupos genéticos e das avaliações das características fenotípicas e classificações de tipo das fêmeas adultas do grupo genético  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir referentes aos Rebanhos Certificados (RC).

Os dados foram submetidos ao teste t Student não pareado a 0,01% de probabilidade ( $p < 0,0001$ ). Utilizou-se o Software Estatístico Action Stat (versão 3.1, Consultoria Estatística e Qualidade – Estatcamp, Brasil).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos Rebanhos Certificados (RC), os mais frequentes foram os grupos genéticos  $\frac{3}{4}$  Holandês +  $\frac{1}{4}$  Gir,  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir e  $\frac{1}{4}$  Holandês +  $\frac{3}{4}$  Gir, respectivamente, e nos Rebanhos Não Certificados (RNC), o mais frequente foi o grupo genético  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir (Tabela 1).

Grupo Genético	Rebanhos Certificados (RC)		Rebanhos Não Certificados (RNC)	
	Nº de Animais	(%)	Nº de Animais	(%)
$\frac{1}{4}$ Hol + $\frac{3}{4}$ Gir	41	5,86	20	8,40
$\frac{3}{8}$ Hol + $\frac{5}{8}$ Gir	126	18,05	14	5,88
$\frac{1}{2}$ Hol + $\frac{1}{2}$ Gir	190	27,23	111	46,64
$\frac{5}{8}$ Hol + $\frac{3}{8}$ Gir	31	4,44	32	13,45
$\frac{3}{4}$ Hol + $\frac{1}{4}$ Gir	235	33,67	57	23,95
$\frac{7}{8}$ Hol + $\frac{1}{8}$ Gir	75	10,75	04	1,68
Total	698	100,00	238	100,00

Tabela 1 – Distribuição da frequência dos grupos genéticos da raça Girolando nos Rebanhos Certificados (RC) e Rebanhos Não Certificados (RNC).

Fonte: Elaborado pelo autor

Esses resultados da frequência dos grupos genéticos dos Rebanhos Certificados (RC) e dos Rebanhos Não Certificados (RNC) estão em consonância com LEMOS et al. (1992) quando afirmam que existe uma multiplicidade de graus de sangue dificultando a adequação do manejo e da nutrição dos rebanhos.

Nos Rebanhos Certificados (RC) foi observada uma maior ocorrência dos grupos genéticos  $\frac{3}{4}$  Holandês +  $\frac{1}{4}$  Gir e  $\frac{7}{8}$  Holandês +  $\frac{1}{8}$  Gir com 235 (33,67%) e 75 (10,75%), respectivamente, em relação aos Rebanhos Não Certificados (RNC) que se constatou uma frequência de 57 (23,95%) do grupo genético  $\frac{3}{4}$  Holandês +  $\frac{1}{4}$  Gir e 04 (1,68%) do grupo genético  $\frac{7}{8}$  Holandês +  $\frac{1}{8}$  Gir.

Em síntese são grupos genéticos com maiores dificuldades de adaptação ao clima tropical e condições adversas presentes nos sistemas de produção tradicionais

(MADALENA, 1998).

É possível que essa maior ocorrência desses genótipos se justifique pelo fato dos sistemas de produção dos Rebanhos Certificados (RC) manterem modelos produtivistas proporcionando uma zona de conforto e, conseqüentemente, melhorando o bem estar dos genótipos com maior percentual de sangue da raça holandesa proporcionando uma maior resposta na produção (MATOS, 2000).

Nos Rebanhos Não Certificados (RNC) foi observado um percentual maior, 46,64%, do grupo genético  $\frac{1}{2}$  em relação ao percentual de 27,23% nos Rebanhos Certificados (RC).

Este percentual maior do grupo genético  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir consiste na melhor adaptação ao ambiente tropical e aos sistemas de produção com níveis tecnológicos baixos e médios, sistemas considerados tradicionais na pecuária leiteira (Tabela 2).

Grupos Genéticos	REBANHOS NÃO CERTIFICADOS (RNC)											
	Níveis dos Manejos											
	Baixo						Médio					
	$\frac{1}{4}$	$\frac{3}{8}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{5}{8}$	$\frac{3}{4}$	$\frac{7}{8}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{3}{8}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{5}{8}$	$\frac{3}{4}$	$\frac{7}{8}$
Infes. de carrapatos	B <sup>3</sup>	B	B	M <sup>2</sup>	M	A <sup>1</sup>	B	B	B	B	B	M
Afecções nos cascos <sup>4</sup>	- <sup>6</sup>	-	1	3	4	-	-	-	-	1	3	-
Ausência de tetas <sup>4</sup>	-	-	-	2	4	-	-	-	-	-	2	-
Escore corporais <sup>5</sup>	3-4	3-4	3-4	2-3	2-3	1-2	4-5	4-5	4-5	3-4	3-4	2-5

Tabela 2 – Infestação de carrapatos, afecções nos cascos, ausência de tetas e escores corporais observados para estimar a adaptação dos grupos genéticos aos sistemas de produção de acordo com os níveis tecnológicos nos Rebanhos Não Certificados (RNC).

Fonte: Elaborado pelo autor

Nível tecnológico baixo: 04 rebanhos. Nível tecnológico médio: 02 rebanhos. <sup>1</sup>A, alta infestação. <sup>2</sup>M, média infestação. <sup>3</sup>B, baixa infestação. <sup>4</sup>, número de animais com afecções nos cascos e ausência de tetas. <sup>5</sup>escores corporais, 1- vaca muito magra; 2- vaca magra; 3- vaca regular; 4- vaca boa; 5-vaca gorda. <sup>6</sup>-, ausência de casos.

LEMOS et al. (1997), RUAS et al. (2004) constataram que o grupo genético  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir tem maior resistência à infestação de parasitos e doenças e nas condições de pior manejo, a heterose encontrada em animais meio-sangue é mais importante, já que quanto mais adversa à condição de ambiente, maior é a expressão da heterose.

As médias das variáveis das características fenotípicas avaliadas nos Rebanhos Certificados (RC) foram superiores as dos Rebanhos Não Certificados (RNC) demonstrando a importância do uso das avaliações fenotípicas nos processos

de obtenção e seleção dos animais (Tabela 3).

Características Fenotípicas	Rebanhos Certificados (RC)		Rebanhos Não Certificados (RNC)	
	(x ± s)	cv (%)	(x ± s)	cv (%)
AG <sup>1</sup>	27,45±1,77	6,40	26,78±1,70	6,30
CC <sup>2</sup>	16,26±1,22	7,50	14,44±1,38	9,60
CL <sup>3</sup>	24,58±2,44	10,30	23,62±3,42	13,90
AR/A <sup>4</sup>	12,49±0,88	7,00	11,19±1,10	9,80

<sup>1</sup>AG, aparência geral. <sup>2</sup>CC, capacidade corporal. <sup>3</sup>CL, características leiteiras. <sup>4</sup>AR/A, aparelho reprodutor e aprumos.

Fonte: Elaborado pelo autor

A Figura 1 demonstra diferenças significativas nas características fenotípicas dos Rebanhos Certificados (RC) em relação aos Rebanhos Não Certificados (RNC).

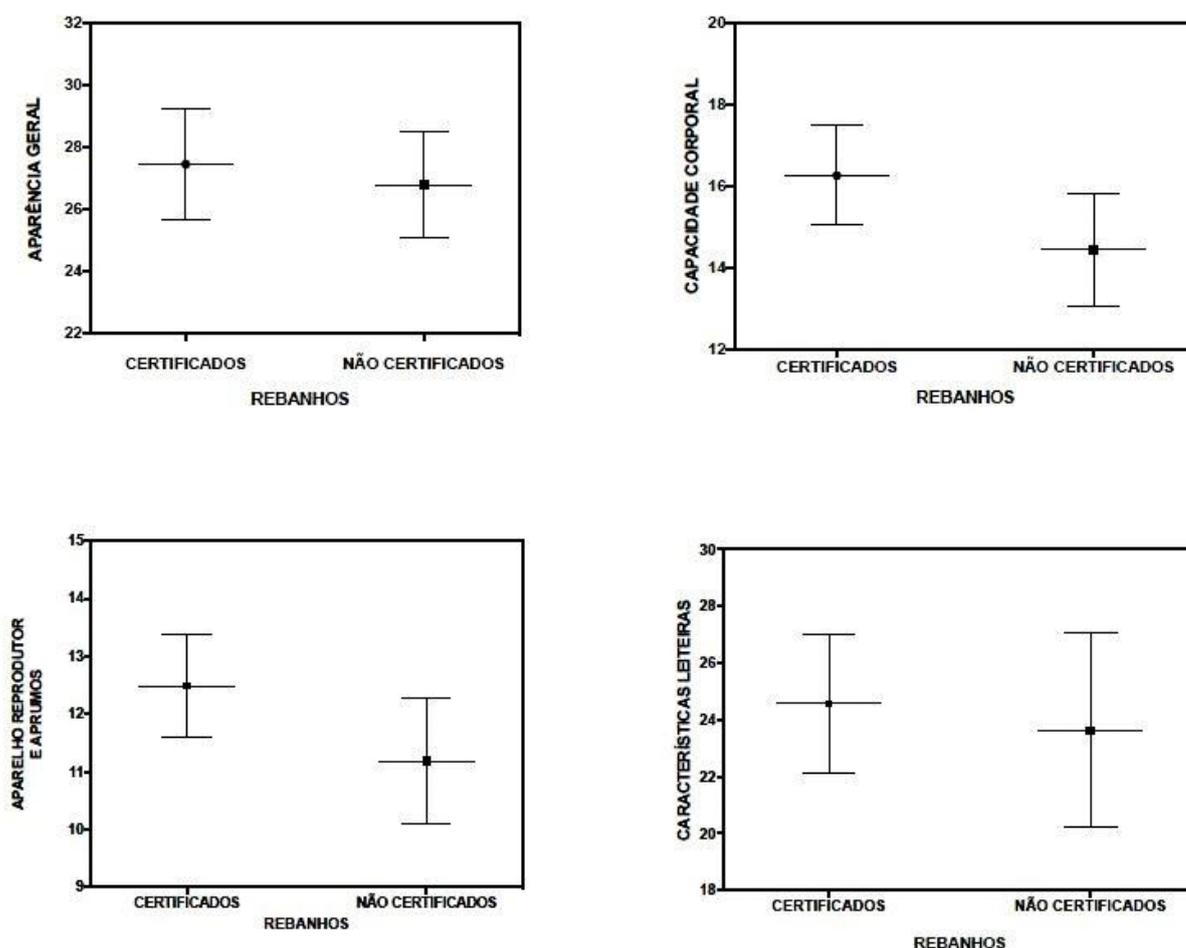


Figura 1 – Comparação das variáveis entre os Rebanhos Certificados (RC) e os Rebanhos Não Certificados (RNC) por meio do teste t Student não pareado ( $p < 0,0001$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor

Estes dados refletem a afirmação disposta por TORRES (1981) quando alega que a escolha e classificação dos animais domésticos com base na sua

conformação é uma ferramenta de seleção utilizada pelo homem a centenas de anos. Além disso, JORGE (2011) complementa que nos processos de negociação dos animais o produtor tendo bom conhecimento do padrão racial e produtivo leva decisiva vantagem sobre aquele que não os tem.

MOURÃO et al. (1996) obtiveram resultados semelhantes aos encontrados nos Rebanhos Não Certificados (RNC) envolvendo 137 fêmeas  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir que foram avaliadas por um técnico credenciado pela Associação Brasileira dos Criadores de Girolando apresentando as seguintes médias e desvios-padrão: 26,64±1,04 para Aparência Geral (AG), 26,75±1,01 para Características Leiteiras (CL), 14,89±0,31 para Capacidade Corporal (CC) e 12,02±0,31 para Aparelho Reprodutor e Aprumos (AR/A).

As variáveis referentes à Capacidade Corporal (CC), Características Leiteiras (CL) e Aparelho Reprodutor/Aprumos dos Rebanhos Não Certificados (RNC) apresentaram uma variação maior em relação às dos Rebanhos Certificados (RC). Estes resultados permitiram constatar que os Rebanhos Certificados (RC) são mais homogêneos nessas variáveis, consideradas características importantes nas avaliações, haja vista serem características quantitativas de cunho produtivo, funcional e de longevidade apresentando maior peso sobre as outras características que somadas acumulam 62 pontos do total de 100 pontos na avaliação. Neste contexto, PEIXOTO et al. (1990) salienta que quanto menor a variação das características dentro de uma população, maior e o grau de uniformização por processo seletivo, e vice versa. Análises dessa natureza são usadas há muito tempo, em trabalhos de melhoramento e em julgamento de animais muito semelhantes.

Nos Rebanhos Certificados (RC), as fêmeas  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir classificadas como BOM PARA +, MUITO BOM e ÓTIMO somaram um percentual de 60,52% e as classificadas como REGULARES apresentaram um percentual de 11,58%. Entretanto, nos Rebanhos Não Certificados (RNC), as fêmeas  $\frac{1}{2}$  Holandês +  $\frac{1}{2}$  Gir classificadas como BOM PARA +, MUITO BOM e ÓTIMO somaram 19,81% e as classificadas como REGULARES apresentaram um percentual de 43,25% (Tabela 4).

Classificação de Tipo	Rebanhos Certificados (RC)		Rebanhos Não Certificados (RNC)	
	Nº de animais	(%)	Nº de animais	(%)
REGULAR	22	11,58	48	43,25
BOM	53	27,90	41	36,93
BOM PARA +	69	36,32	16	14,41
MUITO BOM	42	22,10	06	5,41
ÓTIMO	04	2,10	-	-
EXCELENTE	-	-	-	-
TOTAL	190	10,00	111	100,00

Tabela 4 – Frequência das Classificações de Tipo do grupo genético ½ Holandês + ½ Gir nos Rebanhos Certificados (RC) e Rebanhos Não Certificados (RNC).

Fonte: Elaborado pelo autor

Estes resultados gerados nos Rebanhos Certificados (RC) demonstram que a maioria dos animais ficou concentrada nas classificações mais altas, consequência do trabalho da seleção e do melhoramento genético da Associação Brasileira dos Criadores do Girolando – ABCG.

## 4 | CONCLUSÃO

Com base nos resultados desta pesquisa, pode-se concluir que:

1. Foram identificados todos os grupos genéticos ( $1/4$ ,  $3/8$ ,  $1/2$ ,  $5/8$ ,  $3/4$  e  $7/8$ ) da raça Girolando nos Rebanhos Não Certificados (RNC);
2. A diversidade de grupos genéticos dificulta adequar práticas sanitárias e nutricionais nos sistemas de produção tradicionais;
3. Nos Rebanhos Certificados (RC), verificou-se uma frequência maior dos grupos genéticos  $3/4$  Holandês +  $1/4$  Gir e  $7/8$  Holandês +  $1/8$  Gir em relação aos Rebanhos Não Certificados;
4. Nos Rebanhos Não Certificados (RNC), o grupo genético  $1/2$  Holandês +  $1/2$  Gir foi o mais frequente;
5. Os animais do grupo genético  $1/2$  Holandês +  $1/2$  Gir dos Rebanhos Certificados (RC) foram melhores caracterizados e classificados quanto à sua conformação racial, produtiva e funcional em relação aos animais do grupo genético  $1/2$  Holandês +  $1/2$  Gir dos Rebanhos Não Certificados (RNC).

## REFERÊNCIAS

ABCG. **Regulamento do Serviço de Registro Genealógico da Raça Girolando**. Uberaba, MG, 2014. 74 p.

BODO, I. **Methods and experiences with in situ preservation of farm animals. Expert Consultation on FAO Programmes for the Preservation of Animal Genetic Resources**. 1990. p. 56-64.

- CRUZ, C. D.; REGAZZI A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3.ed. Viçosa, MG, 1997.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Revisada. Viçosa, MG, 2001.
- FACÓ, O. et al. **Idade ao primeiro parto e intervalo de partos de cinco grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil**. Revista Brasileira de Zootecnia, 2005. p. 1920-1926.
- FILHO, W. K. **Parâmetros genéticos para escore de umbigo e características de produção em bovinos da raça Nelore**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2003. p. 594-598.
- JORGE, A. M. **Exterior e Julgamento de Bubalinos**. 2013. Disponível em: < [http://www.fmvz.unesp.br/bufalos/HPbufalos\\_files/Mat\\_Didatico/06\\_EXT\\_JULGAMENO.pdf](http://www.fmvz.unesp.br/bufalos/HPbufalos_files/Mat_Didatico/06_EXT_JULGAMENO.pdf)>. Acesso em: 30 agos. 2014.
- LE MOS, A. M. et al. **Estratégias de cruzamentos entre vacas leiteiras**. Informe Agropecuário, 1992. p. 19-22.
- MADALENA, F. E. **Lucrando com os cruzamentos: a expansão do F<sub>1</sub>**. In: \_\_\_\_\_. Simpósio Nacional da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. Uberaba, MG, 1998. p. 121-126.
- MATOS, L. L. **Sustentabilidade dos sistemas de produção de leite a pasto**. Minas Leite. Juiz de Fora: EMBRAPA/CPGL. 2000. p. 9-17.
- MOURÃO, G. B. et al. **Medidas lineares, pelagem e temperamento em fêmeas mestiças F1**. Belo Horizonte: EV/UFMG. 1996. 86 p.
- PEIXOTO, A. M. et al. **Exterior e julgamento de bovinos**. 3.ed. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. 1990. p. 22-28.
- PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. 6.ed. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte, MG, 2012. p. 105-129.
- RIBEIRO, M. N. et al. **Conservação de raças caprinas no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas**. Recife: IU/UFPE. 2004. 62 p.
- RUAS, J. R. M. et al. **Cria e recria da fêmea F1: Holandês x Zebu para produção de leite**. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. 2004. p. 40-46.
- TORRES, A. D. P. **Melhoramento dos rebanhos: noções fundamentais**. 3.ed. Revisada e ampliada. Editora Nobel. São Paulo, 1981. p. 251-257.

## MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE CARNE MOÍDA

### **Maria Santos Oliveira**

Universidade Federal do Piauí, Curso de Medicina  
Veterinária Bom Jesus-PI

### **Felicianna Clara Fonsêca Machado**

Universidade Federal do Piauí, Curso de Medicina  
Veterinária Bom Jesus-PI

### **Gladiane dos Santos Nunes**

Universidade Federal do Piauí, Curso de Medicina  
Veterinária Bom Jesus-PI

### **Cristiano Pinto de Oliveira**

Universidade Federal do Piauí, Curso de Medicina  
Veterinária Bom Jesus-PI

### **Natylane Eufransino Freitas**

Universidade Federal do Piauí, Curso de Medicina  
Veterinária Bom Jesus-PI

### **Helga Germana de Sousa Ribeiro**

Universidade Federal do Piauí, Curso de Ciências  
Biológicas Bom Jesus-PI

### **Juanna D'arc Fonsêca dos Santos**

Universidade Federal do Piauí, Campus Profa.  
Cinobelina Elvas Bom Jesus-PI

### **Laíze Falcão de Almeida**

Universidade Federal do Piauí, Curso de Medicina  
Veterinária Bom Jesus-PI

### **Vanusa Castro de Sousa**

Universidade Federal do Piauí, Curso de Medicina  
Veterinária Bom Jesus-PI

### **Samara de Castro Sousa**

Universidade Federal do Piauí, Curso de Medicina  
Veterinária Bom Jesus-PI

### **Larissa Maria Feitosa Gonçalves**

Universidade Federal do Piauí, Curso de Medicina  
Veterinária Bom Jesus-PI

### **Antonio Augusto Nascimento Machado Júnior**

Universidade Federal do Piauí, Curso de Medicina  
Veterinária Bom Jesus-PI

**RESUMO:** A análise laboratorial da carne moída permite a obtenção de informações sobre a sua qualidade, condições de higiene de produção e de conservação, e possibilita estimar riscos associados ao seu consumo. De modo geral, as análises para avaliação da carne abrangem provas físico-químicas e microbiológicas. As provas físico-químicas possibilitam conhecer o estado de conservação da carne moída, por meio das modificações provocadas pela degradação de proteínas e lipídeos, pela ação de agentes naturais e de enzimas hidrolíticas endógenas presentes na carne. As microbiológicas permitem detectar microrganismos indicadores da higiene de produção e patógenos capazes de provocar surtos de doenças transmitidas pelos alimentos (DTAs). A combinação de diferentes técnicas e o uso de parâmetros específicos estabelecidos servem para determinar se o produto atende às

exigências da legislação e se está apto ao consumo. As técnicas de análise de carne moída são uma importante ferramenta para o controle de qualidade da carne e para a prevenção de surtos de DTAs, uma vez que norteiam a adoção de melhorias nas condições de produção, conservação e comercialização.

**PALAVRAS-CHAVE:** contaminação, detecção, deterioração, patógenos.

## METHODS OF ASSESSMENT OF QUALITY OF GROUND BEEF

**ABSTRACT:** The laboratory analysis of the ground meat allows to obtain information about its quality, hygiene conditions of production and conservation, and makes it possible to estimate risks associated with its consumption. In general, the meat evaluation analyzes cover physico-chemical and microbiological evidence. The physical-chemical tests allow to know the state of conservation of the ground meat, through the modifications provoked by the degradation of proteins and lipids, by the action of natural agents and endogenous hydrolytic enzymes present in the meat. The microbiologicals allow the detection of microorganisms that are indicators of hygiene of production and pathogens capable of provoking outbreaks of foodborne diseases (DTAs). The combination of different techniques and the use of specific parameters established serve to determine whether the product meets the requirements of the legislation and is fit for consumption. Ground beef analysis techniques are an important tool for the quality control of meat and for the prevention of outbreaks of DTAs, since they guide the adoption of improvements in the conditions of production, conservation and commercialization

**KEYWORDS:** Contamination, pathogens, detection, deterioration.

## 1 | INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana da carne inicia-se durante o abate do animal, por meio do contato com o ambiente, superfícies, utensílios e manipuladores. Na carne moída, o aumento da superfície exposta e a riqueza de nutrientes favorecem a ação microbiana, fazendo da carne um produto altamente perecível. Assim, sob temperaturas inadequadas de conservação, a carne serve como meio de cultura natural para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (HANGUI et al., 2015).

A intensa multiplicação microbiana de deteriorantes provoca alterações nas suas características físicas e químicas, próprios do processo de deteriora (JAY, 2005). Por sua vez, patógenos presentes na carne moída, embora sejam imperceptíveis, podem provocar doenças transmitidas pelos alimentos (DTAs) (NASCIMENTO et al., 2014; SILVA, 2015). As DTAs podem ser infecções, intoxicações ou toxinfecções alimentares (JAY, 2005). Como forma de prevenir a ocorrência dessas doenças,

foram desenvolvidas técnicas para avaliação da inocuidade e qualidade dos alimentos (RODRIGUES et al., 2011).

Neste sentido, as análises microbiológicas servem para investigar a presença ou ausência de microrganismos, além de quantificar grupos microbianos indicadores de higiene (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Por sua vez, as análises físico-químicas permitem conhecer o estado de conservação da carne, através da detecção das modificações ocorridas durante o processo de deterioração (IAL, 2008).

A prática combinada de provas microbiológicas e físico-químicas é capaz de revelar as condições higiênicas de processamento e conservação, além de estimar o risco associado ao seu consumo. Adicionalmente, as análises laboratoriais são indispensáveis para a verificação dos padrões e especificações microbiológicos e físico-químicos, determinados pela legislação (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O aumento da exigência por parte dos consumidores incrementa a busca por alimentos seguros (PINHEIRO et al., 2011). Assim, pode-se considerar que a análise laboratorial da carne é uma ferramenta de grande valor não apenas para os consumidores, mas também para os produtores/elaboradores que desejem atender melhor à essa crescente demanda por produtos mais confiáveis (BERTOLINO, 2010).

Diante do exposto, esta revisão faz uma abordagem sobre os principais métodos laboratoriais utilizados na avaliação da carne moída.

## **2 | ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA CARNE**

Para a carne ser considerada de boa qualidade deve apresentar características sensoriais, nutricionais e sanitárias dentro dos padrões estabelecidos pela legislação (VELHO et al., 2015). No Brasil, as provas para avaliar a qualidade físico-química da carne seguem normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1999). A análise físico-química da carne moída permite conhecer o estado de conservação, as condições higiênicas de produção e detectar modificações relacionadas ao processo de deterioração (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A seguir serão apresentadas as principais provas físico-químicas para avaliação da qualidade da carne moída.

### **2.1 Características sensoriais**

As características sensoriais ou organolépticas da carne são atributos que impressionam os órgãos dos sentidos e podem provocar aceitação ou rejeição por parte dos consumidores (MESQUITA et al., 2014). As provas sensoriais da carne moída baseiam-se, portanto, na percepção da coloração, odor, aspecto e consistência do produto (IAL, 2008).

Para realização das análises sensoriais, retiram-se porções de várias regiões da peça sem grandes vasos, tecidos adiposos e aponeuroses. Em seguida, efetuam-se cortes em pedaços menores para homogeneização em moedor de carne com discos de 5 mm de diâmetro ou em liquidificador sob baixa rotação por dois minutos. As análises devem ser realizadas imediatamente, mas para algumas provas, é possível o acondicionamento da amostra em frascos hermeticamente fechados e mantidos em congelador (BRASIL, 1999).

### *2.1.1 Coloração da carne*

De acordo com a legislação, a carne bovina deve apresentar coloração uniforme, sem manchas claras ou escuras, variando do vermelho rosado ao vermelho pardo. A coloração da carne é conferida pela mioglobina que contribui com 80 a 90% dos pigmentos totais, e em menor grau, pela hemoglobina (BRASIL, 1999, GOMIDE; RAMOS; FONTES, 2013). Diversos fatores podem interferir na coloração da carne fresca: idade, sexo, raça, corte, retenção de água, desnaturação da mioglobina pelo calor, ressecamento e grau de deterioração (WARNER et al., 2010).

### *2.1.2 Coloração da carne*

De acordo com a legislação, a carne bovina deve apresentar coloração uniforme, sem manchas claras ou escuras, variando do vermelho rosado ao vermelho pardo. A coloração da carne é conferida pela mioglobina que contribui com 80 a 90% dos pigmentos totais, e em menor grau, pela hemoglobina (BRASIL, 1999, GOMIDE; RAMOS; FONTES, 2013). Diversos fatores podem interferir na coloração da carne fresca: idade, sexo, raça, corte, retenção de água, desnaturação da mioglobina pelo calor, ressecamento e grau de deterioração (WARNER et al., 2010).

A ação microbiana sobre a mioglobina provoca a separação entre o grupo heme e as proteínas, com formação de coloração esverdeada (ALCANTARA et al., 2012). Não existe uma recomendação geral quanto a mensuração da cor, pois instrumentos de medidas como colorímetros e espectrofotômetros podem ter características distintas quanto o diâmetro de abertura, tipo de iluminador e ângulo de observação, produzindo resultados semelhantes, mas não iguais (CAMILLA et al., 2015).

### *2.1.3 Consistência da carne*

A carne e a gordura devem apresentar consistência firme, compacta e elástica e levemente úmida. Quando inicia a putrefação, a superfície torna-se viscosa ou

limosa com perda da firmeza (BRASIL, 1999; IAL, 2008).

#### *2.1.4 Odor*

A carne moída fresca apresenta odor suave e agradável. À medida em que avança o processo de deterioração, passa a ser liberado odor amoniacal desagradável (BAPTISTA, et al., 2013). De acordo com PARDI et al. (2006), o odor da carne fresca lembra um ligeiro odor ácido láctico comercial e a carne de animais idosos possui um odor mais intenso que a dos animais jovens da mesma espécie.

#### *2.1.5 Prova de cocção*

A prova de cocção também possibilita a percepção de alterações na aparência, textura e sabor da carne moída (MESQUITA et al., 2014).

Para a prova, transferem-se 30g da carne moída para um béquer de 250 mL e adiciona-se água suficiente para cobrir a amostra. Em seguida, homogeneiza-se a amostra com auxílio de um bastão de vidro e cobre-se com vidro de relógio. O conjunto deve ser aquecido até o início dos primeiros vapores. Observar o surgimento do odor amoniacal, sulfídrico ou de ranço. Após isso, prossegue-se com a fervura por mais cinco minutos para observação das características da carne e do caldo. O sabor deve ser próprio da carne e a textura firme (BRASIL, 1999).

### **2.2 Prova de Filtração**

O princípio da prova de filtração se baseia na passagem do extrato aquoso da carne por um papel filtro qualitativo com porosidade padronizada, em um determinado tempo. Essa prova avalia o estado de decomposição da carne, através dos produtos solúveis das proteínas, que ficam acondicionados, fazendo a lentidão na filtração (MESQUITA et al., 2014).

A prova é realizada colocando-se 10g da amostra em Erlenmeyer e acrescentando 100 ml de água destilada. Após agitação vigorosa por 15 minutos, a mistura é filtrada em papel de filtro qualitativo, cronometrando-se o tempo. Deve-se considerar a classificação de acordo com o tempo de filtração, considerando-se: carne fresca e sã, com filtração em cinco minutos; carne de média conservação, com filtração entre 6 e 10 minutos; e carne suspeita, provavelmente alterada, a filtração excede os 10 minutos (BRASIL, 1999).

### **2.3 Determinação do pH**

A determinação do pH da carne tem por finalidade determinar as condições ácida ou básica por meio da concentração efetiva dos íons de hidrogênio (SILVA;

FURTADO, 2016).

Para a determinação do pH, pesa-se, 50g da amostra de carne moída, coloca em um Erlenmeyer de 150 mL, e em seguida, adicionam-se 10 mL de água destilada. Após homogeneizar, o conjunto deve ser posto em repouso por 10 minutos e em seguida, faz-se a leitura com o pHmetro devidamente calibrado (IAL, 2008). Conforme os resultados de aferição, a carne moída com pH entre 5,8 e 6,2 são classificadas como boas para consumo; carnes com pH em torno de 6,4 estão aptas ao consumo imediato, pois este é um limite crítico; e carnes com pH acima de 6,4 já estão em decomposição e não devem ser consumidas (IAL, 2008).

## 2.4 Pesquisa de amônia – Prova de Nessler

Para pesquisa de amônia, transferem-se para tubos de ensaio, 2 mL do reagente de Nessler. Em seguida, acrescentam-se 10 gotas do filtrado obtido na prova de filtração e observa-se a coloração formada. Nesta prova, o filtrado é misturado com o reagente de Nessler que tem a capacidade de reagir com o radical amônio, resultante da proteólise, formando um complexo de coloração amarela. Amostras positivas para a presença da amônia desenvolvem uma coloração de amarelo a alaranjada e amostras negativas têm coloração amarelo esverdeada (BRASIL, 1999).

## 2.5 Pesquisa de Gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S)

A pesquisa de gás sulfídrico é realizada pela prova do papel de chumbo e baseia-se na decomposição de aminoácidos sulfurados com a liberação de enxofre. Em meio ácido, o enxofre se transforma em H<sub>2</sub>S, que ao se combinar com o acetato de chumbo, produzem sulfeto de chumbo, o qual enegrece o papel (SILVA JUNIOR, 2013).

A prova é realizada colocando-se em um Erlenmeyer de 125mL, 10g da carne moída em 25 mL de água destilada, e após a homogeneização, coloca-se uma tira de papel de acetato de chumbo preso à tampa do Erlenmeyer, para submeter o conjunto ao banho-maria fervente por 10 minutos. Conforme o grau de enegrecimento do papel, consideram-se três diferentes graus de produção de sulfeto de chumbo. Assim, uma cruz (+) significa pouca produção de sulfeto de chumbo e três cruces (+++), muita produção deste composto (IAL,2008). Naturalmente, uma elevada produção de sulfeto de chumbo indica adiantado processo de decomposição da carne moída (JUSTÉ; THOMMA; LIEVENS, 2008).

### 3 | ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE CARNE MOÍDA

Há uma enorme quantidade de tipos microbianos que podem compor a microbiota da carne moída (JAY, 2005). Embora haja técnicas laboratoriais específicas para pesquisa de inúmeros microrganismos, a investigação de todos os patógenos conhecidos nas amostras seria impraticável e onerosa. Por esse motivo, usualmente são empregadas técnicas de detecção e quantificação de alguns grupos de microrganismos que servem como indicadores de qualidade (CUNHA; SILVA, 2006).

Os microrganismos indicadores de qualidade dos alimentos devem apresentar características como: rápida detecção; facilidade de distinção de outros membros da microbiota; estar sempre presente quando o patógeno associado estiver; e apresentar número, taxa de crescimento, morte e necessidades semelhantes a ele, além de não pertencer a microbiota natural do alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Além da pesquisa de indicadores microbianos, faz-se necessário, em alguns casos, investigar a presença de patógenos específicos (MANGEN et al., 2011). A escolha dos microrganismos patogênicos a serem pesquisados deve levar em conta o tipo de alimento e o objetivo da análises (DAMER et al., 2014). Neste sentido, *Salmonella ssp*, *Staphylococcus ssp* e *Escherichia coli* têm sido frequentemente investigados na carne moída, no Brasil e em outros países, devido ao risco potencial de veiculação pelo consumo de carne moída e por serem agentes envolvidos em surtos de DTAs (VIPHAM et al., 2012; LEOTTA et al., 2016).

#### 3.1 Contagem em placas de microrganismos indicadores

O método mais utilizado para quantificação de microrganismos indicadores e patogênicos em alimentos é a contagem em placas (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Esse método pode ser utilizado para contagens de grandes grupos microbianos, tais como: bactérias aeróbias mesófilas, psicotróficas, termófilas, bolores e leveduras, mas também é empregada na quantificação de gêneros e espécies, como *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, com algumas variações relacionadas ao meio utilizado, temperatura e tempo de incubação, de cada microrganismo (MARCHI et al., 2012).

A técnica de contagem em placas baseia-se no princípio de que cada microrganismo viável ou agrupamento microbiano presente no alimento é capaz de formar uma única colônia. Assim, sob condições adequadas de cultivo, as colônias formadas e contabilizadas no momento da leitura, fornecem resultados expressos em unidades formadoras de colônia por mL ou grama de alimento (UFC/mL ou g) (BRASIL, 2003).

De acordo com a instrução normativa nº 62/2003, para a contagem de bactérias, as amostras são homogeneizadas e diluídas em série, com diluentes próprios para o microrganismo pesquisado. Em seguidas, alíquotas dessas diluições são transferidas para placas de Petri esterilizadas. Há duas formas distintas de semeio para contagem microbiana: em profundidade (*pour-plate*), quando o meio sólido é vertido sobre o inócuo; e em superfície (*spread-plate*), onde o inócuo é espalhado sobre o meio com o auxílio de uma alça de Drigalski. Em ambos os casos, procede-se com a incubação, sob temperatura controlada (BRASIL, 2003).

Embora a técnica de contagem em placas siga o mesmo princípio básico para bactérias e fungos, as características biológicas de cada grupo microbiano resultaram no ajuste das técnicas de maneira a prover as condições ideais de cultivo de forma diferenciada e de modo a inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis.

### 3.1.1 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas

A quantificação de bactérias aeróbias mesófilas enumera bactérias capazes de se desenvolverem em temperatura de 35 a 37°C, presentes no alimento tanto na forma vegetativa quanto na forma esporulada. Essa técnica não diferencia tipos bacterianos, mas fornece informações sobre as práticas de manipulação, matéria prima utilizada, condições de processamento e vida útil do alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A legislação brasileira não estabelece padrão para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas na carne crua. Entretanto, contagens em torno de  $10^7$  UFC/g tornam o produto impróprio para o consumo devido às alterações sensoriais (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O meio utilizado na técnica de contagem de bactérias aeróbias mesófilas é o ágar padrão para contagem (PCA). Esse meio é fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento de diversos microrganismos, além de conter glicose como fonte de energia.

A técnica inicia com a pesagem asséptica de 25 gramas da amostra, diluídos em 225 mL de água peptonada a 0,1%, para obtenção da diluição inicial  $10^{-1}$ . Para a diluição  $10^{-2}$ , retira-se, 1mL da diluição inicial  $10^{-1}$  e coloca em tubo contendo 9 mL de água peptonada a 0,1%, desta, um mL é retirado para outro tubo de água peptonada 0,1% para formação da diluição  $10^{-3}$ , e assim sucessivamente são elaboradas as diluições subsequentes. Para semeadura, transfere-se um mL de cada diluição decimal, para placas de Petri estéreis, correspondente à cada diluição. Logo após, adicionam-se de 15 a 20 mL do ágar padrão para contagens (PCA), previamente esterilizado, fundido e resfriado a 45°C. Posteriormente, realiza-se a homogeneização do ágar com o inóculo e após solidificação, as placas são

invertidas e incubadas em estufa incubadora a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas. A leitura é realizada em placas com 25 a 250 colônias (FENG et al., 2002; BRASIL, 2003).

### 3.1.2 Contagem de Coliformes Totais

Coliformes totais são bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em temperatura de crescimento de  $35$  a  $37^\circ\text{C}$ , por 24 a 48 horas. São representados pelos gêneros da família *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella* (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A razão para esse agrupamento são as características em comum entre os grupos (DAMER et al., 2014).

Apesar de os coliformes abrangerem diversos gêneros e espécies não entéricas, há espécies originárias do trato intestinal dos seres humanos e dos animais. Por esse motivo, após a contagem de coliformes totais, normalmente se realiza a pesquisa de coliformes termotolerantes e *E. coli*. A intensa contaminação da carne moída por coliformes totais reflete as condições de manipulação do alimento e do ambiente, enquanto a contaminação por coliformes termotolerantes e *E. coli* são indicativos de um possível contato com material fecal (JORIS et al., 2012).

A técnica de contagem de coliformes em placas inicia, com a pesagem asséptica de 25 gramas da amostra, diluídos em 225 mL de água peptonada a 0,1%, para obtenção da diluição inicial  $10^{-1}$ . Para a diluição  $10^{-2}$ , retira-se, 1mL da diluição inicial  $10^{-1}$  e coloca em tubo contendo 9 mL de água peptonada a 0,1%, e desta 1mL é retirado para outro tubo de água peptonada 0,1% para formação da diluição  $10^{-3}$ , e assim sucessivamente são elaboradas as diluições subsequentes. Para inoculação, transfere-se 1 mL de cada diluição para placas de Petri esterilizadas, em seguida adiciona-se cerca de 1,5 mL do ágar cristal violeta vermelho neutro bile, previamente fundido e mantido a  $46-48^\circ\text{C}$  em banho-maria. Logo após, homogeneizam-se, cuidadosamente as placas, e estas devem ser mantidas em repouso para total solidificação. As placas são incubadas em posição invertida a uma temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas. Para a leitura, selecionam-se placas contendo entre 15 a 150 colônias com coloração rósea e com 0,5 a 2 mm de diâmetro, rodeadas ou não por uma zona de precipitação da bile presente no meio (BRASIL, 2003).

A legislação brasileira não estabelece limite para contagem de coliformes totais em carne moída, mas por serem microrganismos presentes no ambiente, contagens elevadas desses microrganismos revelam exposição a condições higiênicas precárias (ROSINA; MONEGO, 2012). Nesses casos, deve-se proceder com a pesquisa de coliformes termotolerantes e *E. coli*, os quais servem como indicadores de contaminação por material fecal (SOUSA, 2006).

### *3.1.3 Contagem de bolores e leveduras*

Os bolores são fungos multicelulares que produzem estruturas filamentosas e as leveduras são fungos unicelulares, esféricos ou ovoides que se reproduzem por brotamento (MAZIERO; BERSOT, 2010). Bolores e leveduras são microrganismos diversificados e estão amplamente distribuídos no ambiente, nos animais e no homem (TRABULSI, 2005). Altas contagens desses microrganismos revelam falhas nas condições higiênicas dos equipamentos, no processamento e contaminação da matéria prima (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A contaminação por fungos em alimentos merece atenção, devido a capacidade de algumas espécies produzirem toxinas com potencial carcinogênico (SILVA JR, 2007). Desse modo, instalações e utensílios devem ser mantidos limpos, por serem considerados fontes importantes de contaminação da carne processada (MAZIERO; BERSOT, 2010).

A contagem de bolores e leveduras em placas baseia-se na capacidade desses microrganismos se desenvolverem em meios de cultura com pH próximo a 3,5 e temperatura de incubação de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  (BRASIL, 2003).

O meio utilizado para a técnica de contagem de bolores e leveduras é o ágar batata dextrose (ADB), o qual apresenta em sua composição batata que estimula a produção dos esporos em bolores, e dextrose que favorece o crescimento. Após o preparo do meio, faz-se a adição de 10 mL/L, do acidificante ácido tartárico a 10%, para inibição da microbiota bacteriana presentes no alimento. A acidificação do meio é dispensada quando são utilizados meios de cultura contendo antibióticos (BRASIL, 2003).

A técnica inicia-se com a pesagem asséptica de 25 gramas da amostra, diluídos em 225 mL de solução salina peptonada a 0,1%, para obtenção da diluição inicial  $10^{-1}$ . Para a diluição  $10^{-2}$ , retira-se, 1mL da diluição inicial, coloca em tubo contendo 9 ml de solução salina peptonada a 0,1%, e desta 1mL é retirado para outro tubo de solução salina peptonada a 0,1% para formação da diluição  $10^{-3}$ , e assim para as demais diluições. Para a semeadura, inoculam-se em placas 0,1ml das diluições sobre a superfície do ágar e com auxílio da alça de Drigalski, espalha-se o inóculo por toda a superfície do meio para total absorção. Em seguida, as placas são incubadas sem inverter, em temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 5 a 7 dias em estufa incubadora. Para a contagem, selecionam-se placas que contém de 15 a 150 colônias e os resultados são expressos em UFC/g ou mL (BRASIL, 2003).

### *3.1.4 Métodos rápidos para contagem de microrganismos*

O sistema Petrifilm™ é um recurso alternativo para contagem de bactérias em alimentos, de modo mais rápido que o método convencional (CIROLINI et al., 2014).

O sistema consiste no uso de placas prontas contendo meio de cultura com diferentes tipos de nutrientes, géis hidrossolúveis a frio, corantes e indicadores apropriados para a recuperação dos microrganismos (JASSON et al., 2010). Essas análises ficam reduzidas a três etapas: inoculação, incubação e leitura. Assim, a utilização das placas Petrifilm™ dispensa a prévia preparação de meios de culturas e vidrarias. Outras vantagens do uso dessas placas é a facilidade de leitura, redução do espaço para incubação e possibilidade de congelamento para posterior leitura (FUNG, 2002). Adicionalmente, essas placas não quebram e não derramam, de modo que há uma redução no risco de acidentes uma vez que não quebram e não derramam (BRASIL, 2005).

A inoculação de amostras em placas Petrifilm™ não requerem habilidades especiais. As placas possuem um filme plástico na parte superior, o qual deve ser levantado para inoculação da alíquota. As diluições de amostras devem seguir os mesmos procedimentos descritos para a contagem convencional. Após adicionar a alíquota, o filme plástico deve ser repostado na posição original e, com auxílio de um difusor plástico, a amostra é distribuída uniformemente na área determinada da placa. Após a solidificação do gel, as placas devem ser incubadas sem inverter, na temperatura e tempo determinado pelo fabricante para cada microrganismo. Após o período de incubação, as colônias visíveis são enumeradas e o resultado é expresso em UFC/g ou mL (BARROS et al., 2007).

No mercado são encontradas placas Petrifilm™ para contagem total de bactérias aeróbias; coliformes totais; coliformes e *E. coli*; bolores e leveduras; *Staphylococcus aureus* e *Listeria sp.* (BRASIL, 2005).

#### *3.1.4.1 Petrifilm™ (AC) para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas*

As placas Petrifilm™ (AC) possuem na sua base o ágar padrão para contagem e o corante indicador 2, 3, 5 cloretos de trifeniltetrazólio, que é reduzido pela ação das bactérias em crescimento, conferindo a coloração vermelha. As colônias vermelhas proporcionam um contraste melhor, facilitam a contagem e a distinção das partículas opacas do alimento.

Ao adicionar o inóculo, os nutrientes são hidratados e o gel é solidificado. As placas são incubadas à temperatura de 32-35°C, por 24 a 48 horas (BRASIL, 2005, CASAROTTI; PAULA; ROSSI, et al., 2008).

#### *3.1.4.2 Petrifilm™ (YM) para contagem de bolores e leveduras*

A utilização do ágar Sabouraud suplementado com glicose nas placas Petrifilm™ YM favorece o desenvolvimento dos fungos, e os antibióticos clortetraciclina e

cloranfenicol, inibem o crescimento bacteriano (MARTINS; FIÚZA; MARTINS, 2013). Além disso, a presença de um indicador de fosfatase, faz com que as colônias corem em azul, uma vez que as células viáveis produzem essa enzima de modo a ativar o indicador presente no meio. Essas placas são incubadas de 20 e 25°C por 48±2 horas (BARROS et al., 2007).

Normalmente, colônias de bolores são grandes, com bordas difusas e podem corar de maneira variada além de azul esverdeado. Por sua vez, colônias de leveduras são tridimensionais, pequenas, possuem bordas definidas e apresentam coloração uniforme variando de rosa a azul esverdeado (OLIVEIRA et al., 2015).

#### 3.1.4.3 *Petrifilm™ para contagem de coliformes e Escherichia coli*

Embora a técnica dos tubos múltiplos seja a metodologia mais utilizada para a pesquisa de coliformes na carne, as placas Petrifilm™ são consideradas sensíveis e eficientes para a detecção de coliformes totais e *E. coli* (SILVA et al., 2006). Essas placas contêm, além do agente geleificante, o ágar vermelho violeta bile e o corante indicador 2, 3, 5 - cloreto de trifeniltetrazólio, para facilitar a enumeração das colônias. Após incubação das placas a 35±1°C, por 24±2 horas, procede-se com a leitura, considerando-se positivas as colônias coradas em vermelho, por redução do indicador, e com bolhas de gás proveniente da fermentação da lactose (BRASIL, 2005).

Além das placas para quantificação de coliformes, há placas específicas para a contagem de *Escherichia coli* (Petrifilm™ EC). Essas placas possuem como meio de cultura base, o ágar vermelho violeta bile, o corante indicador 5 bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-glicuronídeo, que indica a atividade glicuronidásica e agentes geleificantes solúveis em água fria. As placas Petrifilm™ EC têm capacidade para a quantificação bactérias presentes em 1 mL de alíquota, mas há placas mais sensíveis (Petrifilm™ High Sensitive), as quais possibilitam inocular 5 mL de alíquota por placa. A maioria das *Escherichia coli* produz colônias azuis associadas a bolhas de gás, isso ocorre devido a glicuronidase produzida pela *Escherichia coli* que reage com o corante indicador na placa, formando um precipitado azul em torno da colônia. A incubação à temperatura de 35±1°C, por 24±2 horas em estufa incubadora, e para leitura, selecionam-se placas contendo entre 15 e 50 colônias (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

#### 3.1.4.4 *Petrifilm™ para contagem de Staphylococcus sp.*

A presença do ágar Baird-Parker modificado nas placas Petrifilm™ favorecem o desenvolvimento seletivo de *Staphylococcus sp.* Caso seja necessário, a utilização de um disco de gel especial possibilita identificar *S. aureus* em todas as colônias suspeitas. Esse disco possui uma versão cromogênica modificada do meio Baird-

Park, seletivo e diferencial para *Staphylococcus aureus* e permite o crescimento dessas bactérias e a inibição da proliferação de outros espécimes bacterianos (SILVA et al., 2005). Colônias positivas apresentam cor vermelho-violeta. Assim como nas demais placas, os resultados quantitativos são expressos em UFC/g (FERREIRA et al., 2011).

O uso de placas Petrifilm™ é reconhecido pela Association Official Analytical Chemists (AOAC) e, no Brasil, pelo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005). Apesar de serem mais rápidos e serem de rápida leitura, o sistema Petrifilm™ é realizado com material descartável e não possibilita reuso, de modo que em alguns casos, a técnica se torna mais onerosa que o sistema convencional o qual utiliza meios de cultura e placas de vidro laváveis e esterilizáveis.

### 3.2 Determinação do número mais provável de coliformes totais e termotolerantes

A técnica dos tubos múltiplos é um método que permite estimar a densidade de microrganismos, como coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*, em uma amostra. Diferentemente da contagem em placas, essa técnica fornece apenas uma estimativa baseada na quantidade de tubos positivos nas diferentes diluições decimais, e não uma contagem fixa de células viáveis ou unidade formadora de colônias (SILVA, 2007). Para que seja possível essa estimativa, devem ser preparadas séries de tubos de pelo menos três diluições decimais da amostra. De cada diluição, alíquotas iguais são transferidas para três ou para cinco tubos contendo meio de cultura líquido. Todos os tubos são incubados, em temperatura recomendada para cada microrganismo, e em seguida, os positivos são identificados, baseando-se na ocorrência de turvação e fermentação nos tubos de Durham (BRASIL, 2003).

A leitura de resultados obtidos pela técnica dos tubos múltiplos informa sobre a população presuntiva de microrganismos, mas a partir dos tubos considerados positivos, são realizadas inoculações em caldos e ágar seletivos, para obterem-se informações sobre a população microbiana real (BRASIL, 2003).

#### 3.2.1 Coliformes totais

A técnica dos tubos múltiplos para determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais está dividida nas etapas presuntiva e confirmativa. A etapa presuntiva, inicia-se, com a preparação das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , a partir da pesagem asséptica e transferência de 25 gramas da carne moída para um frasco contendo 225 mL de água peptonada a 0,1%, para preparação da diluição  $10^{-1}$ . As diluições subsequentes são efetuadas por adição de 1 mL da diluição anterior em 9 mL da água peptonada. Conforme a necessidade e o objetivo da análise, podem-

se elaborar mais de três diluições, e após o preparo, 1 mL de cada diluição será transferido, com o auxílio de pipeta estéril, para tubos de ensaio contendo 9 mL do caldo lauril sulfato triptose, com tubos de Durhan invertido. Uma vez inoculados, os tubos devem ser incubados a 35°C por 24-48 horas. Serão considerados positivos os tubos que apresentarem turvação e produção gás (BRASIL, 2003).

Na prova confirmativa, alçadas dos tubos considerados positivos na prova presuntiva são inoculadas em tubos contendo 10 mL de caldo verde brilhante bile lactose 2%, com tubos de Durhan invertidos. Em seguida, esses tubos são incubados a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas e, na leitura, consideram-se positivos os que apresentam turvação e formação de gás. Os resultados das provas presuntiva e confirmativa são expressos como NMP/g de carne, com o auxílio de uma tabela específica (BRASIL, 2003).

### 3.2.2 Coliformes termotolerantes

Os coliformes termotolerantes possuem a capacidade de fermentarem lactose a 45°C com produção de gás (BRASIL, 2003). *Escherichia coli* é a principal representante do grupo e corresponde a cerca de 90% dos espécimes isolados em cultivos positivos de coliformes termotolerantes (MARCHI et al., 2012). A pesquisa de coliformes termotolerantes, está ligada ao interesse de investigar a presença de coliformes de origem gastrointestinal. Entretanto, os gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella*, apesar de serem termotolerantes, podem apresentar origem não fecal e compõem a microbiota natural da água, solo e vegetais (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O caldo *Escherichia coli* é um meio líquido seletivo de coliformes termotolerantes. A lactose presente no meio favorece o crescimento de bactérias lactose positivas, as quais produzem gás ao fermentarem esse açúcar. Por sua vez, os sais biliares inibem o crescimento de bactérias Gram positivas ou de espécies microbianas não adaptadas a microbiota intestinal (BRASIL, 2003).

Para a determinação do NMP de coliformes termotolerantes na carne moída, alçadas dos inóculos de tubos positivos na prova confirmativa de coliformes totais são inoculadas em tubos contendo 9 mL do caldo *Escherichia coli*. Em seguida, os tubos são incubados em Banho-maria a 44,5°C por 24-48 horas. Assim como nas etapas anteriores, consideram-se positivos os tubos com produção de gás e turvação. De igual modo, a leitura é efetuada com auxílio de tabela específica (FENG et al., 2002). Resultados positivos para coliformes termotolerantes não indicam necessariamente contaminação por material fecal, mas a partir dos tubos positivos, a presença *E. coli* pode ser confirmada em meios seletivos adequados (MENDONÇA; GRANADA, 2012).

### 3.3 Pesquisa de patógenos

#### 3.3.1 Isolamento de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, não-esporulados, fermentam glicose e lactose com produção de ácido e gás. Além disso, apresentam motilidade por meio de flagelos peritríquios e se multiplica em temperatura ideal de 44-45,5°C (SILVA et al., 2010; KNOBL et al., 2012).

A presença de *E. coli* na carne moída indica contaminação por material de origem fecal, em alguma das etapas que antecedem o momento da coleta (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Além disso, o isolamento de *E. coli* demanda atenção, pois a espécie contém patógenos, dentre os quais se destaca *E. coli* O 157H7, sorotipo associado a surtos de doenças transmitidas pelos alimentos (DTAs) (DAMER et al., 2014).

Para isolamento de *E. coli*, a partir de tubos positivos para coliformes termotolerantes, alíquotas são semeadas com alça de platina, em forma de estrias, em placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno. Essas placas são incubadas em temperatura de 35 a 45°C. Após o período de incubação, as colônias com características de *E. coli* (nucleadas e com centro preto e brilho verde metálico), devem ser isolados para serem submetidas às provas bioquímicas (SILVA et al., 2010).

As colônias típicas e com coloração verde metálica são investigadas e confirmadas por meio das provas bioquímicas de indol (SIM), vermelho de metila (VM), Voges Proskauer (VP) e Ágar Citrato de Simmons (método denominado IMViC) (FENG et al., 2011).

O princípio da prova do Indol é a degradação do triptofano com formação do indol, através da adição do reativo de Kovacs. Para análise, transferem-se, com a alça de platina, culturas suspeitas de *E. coli* para tubos contendo o meio de cultura SIM e incubam-se por 24 horas. Decorrendo esse período, adicionam-se em cada tubo 3 gotas do reativo de Kovacs para observação da superfície do meio. Para colônias positivas o reativo cora em vermelho na superfície do meio (FENG et al., 2011).

A prova do Citrato de Simmons, tem como princípio a utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono e de nitrogênio. Com essa utilização, ocorre a alcalinização do meio, fazendo a mudança de cor de verde para azul. Para a análises, transferem-se, com a alça de platina, colônias suspeitas para tubos contendo o meio citrato de Simmons. Em seguida, incubam-se os tubos por 24 horas a 35°C. Os tubos com coloração azul são considerados positivos e os corados em verde são

negativos (FENG et al., 2011).

As provas de vermelho de metila e Voges-Proskauer (VM-VP) baseiam-se no metabolismo do ácido pirúvico. O vermelho de metila é utilizado como o indicador de pH abaixo de 4.4 e acima de 6.2 e o Voges-Proskauer determina a capacidade de os microrganismos produzirem produtos finais não ácidos ou neutro, a partir do metabolismo da glicose (FENG et al., 2011).

Para o teste, são inoculadas colônias suspeitas no caldo VM-VP e, estes são incubados a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas. Para a prova vermelho de metila transfere-se 1 mL do caldo VM-VP para um tubo e adicionam-se 5 gotas do vermelho de metila para observação da coloração. Colônias positivas apresentam cor vermelho brilhante e as negativas, colônias laranjas amareladas. Para a prova Voges-Proskauer, retira-se assepticamente 1 mL do caldo VM-VP, colocam-se em tubo e adicionam-se 0,6 mL de alfa-naftol a 5% e de KOH a 40%. Após agitação cuidadosa, o conjunto é posto em repouso, por 5 minutos. Tubos que apresentarem coloração vermelha-rósea na superfície do meio indicam positividade e as colônias negativas devem ser incubadas novamente para repetir a prova após 48 horas (FENG et al., 2011).

### 3.3.2 Isolamento de *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* spp. pertence à família *Enterobacteriaceae*, e são bacilos gram-negativos não produtores de esporos. São anaeróbios facultativos, produzem gás a partir de glicose e utilizam citrato como fonte de carbono (FORSYTHE, 2013). Com temperatura ótima de crescimento em torno de  $37^\circ\text{C}$ , podem se multiplicar até  $47^\circ\text{C}$ ; a faixa ideal de pH é de 6,5 a 7,5, mas *Salmonella* spp. pode se desenvolver em ambientes com pH situado entre 4,5 a 9 (SILVA, et al., 2010).

*Salmonella* é considerada uma das principais bactérias envolvidas em surtos de DTAs e tem como reservatório o trato intestinal do homem e os animais. Essas bactérias estão amplamente disseminadas no ambiente e apresentam grande impacto na saúde e na economia mundial (JAY, 2005).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, entre os anos de 2007 a 2016 foram registrados 6.632 surtos de DTAs no Brasil, e destes, *Salmonella* sp. foi responsável por 7,5% dos casos (BRASIL, 2016).

A presença de *Salmonella* sp. na carne moída é, portanto, uma importante preocupação para a saúde pública (FERREIRA; SIMM, 2012). Por esse motivo, a RDC nº 12, de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige como padrão para carnes e derivados a ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas de alimento (BRASIL, 2001).

A técnica para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos envolvem cinco etapas: 1-pré-enriquecimento, em caldo não seletivo para restaurar células

injurizadas; 2-enriquecimento seletivo, onde o cultivo é colocado novamente para multiplicação de *Salmonella* spp., 3-semeadura em meios seletivos sólidos que restringem a multiplicação de outras bactérias; 4- testes bioquímicos pelo qual se obtém dados fenotípicos da cultura isolada; 5- sorotipagem para identificação antigênica (BRASIL, 2003).

O uso de placas prontas de Petrifilm™ fornece resultado presuntivo e confirmação bioquímica na pesquisa de *Salmonella* sp. Essas placas contêm os caldos *Salmonella* e rappaport-vassiliadis que enriquecem e suplementam, para recuperação e crescimento de *Salmonella* sp. A prova presuntiva é realizada hidratando-se a placa com 2 mL de água destilada e transferindo-se a amostra em análise, em forma de estrias no gel. Em seguida, as placas são incubadas a 41,5 °C por 24h. Colônias suspeitas são submetidas a confirmação bioquímica por meio de um disco de confirmação, com incubação a 41,5 °C por 4 horas. As colônias confirmadas de *Salmonella* sp. adquirem coloração azul escuro ou negra com centro com precipitado azul (BRASIL, 2005).

### 3.3.3 Contagem e isolamento de *Staphylococcus aureus*

As bactérias que compõem o gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, pertencentes à família *Micrococcaceae*, medem de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro e são imóveis. São bactérias mesófilas, que crescem em temperatura de 7 a 48°C, e pH 4 a 10, mas é possível sua multiplicação em alimentos com pH variando entre 4,0 e 9,8. A produção de enterotoxinas ocorre entre 10 e 46°C, com valor ótimo entre 40 e 45°C (FORSYTHE, 2013).

Os estafilococos não são resistentes ao calor e são destruídos facilmente na pasteurização ou no cozimento dos alimentos. As toxinas, ao contrário, são consideradas altamente resistentes, tolerando tratamentos térmicos tão severos como a esterilização dos alimentos (SILVA et al., 2007). A intoxicação alimentar provocada por *Staphylococcus aureus* provém da ingestão das enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante a sua multiplicação no alimento, normalmente quando a contaminação é superior a 10<sup>6</sup> de *Staphylococcus aureus*/g do alimento (SANTANA et al., 2010). Os sintomas mais comuns da intoxicação são vômitos e diarreias, com manifestação entre duas a seis horas após a ingestão da toxina (OBESO et al., 2010).

O homem e os animais são considerados os principais reservatórios de estafilococos, onde estão concentrados sobretudo nas narinas, garganta e pele, mas o gênero está amplamente distribuído na natureza. Apesar dos manipuladores de alimentos serem considerados as principais fontes de contaminação, quando há surtos, os equipamentos e as superfícies também podem ser fontes de contaminação

cruzada (FORSYTHE, 2013).

A contagens de *Staphylococcus* sp. inicia-se com a inoculação das diluições da amostra em Ágar Baird-Park para o crescimento na presença de telurito de potássio com cloreto de lítio e glicina. O ágar Baird-Park quando suplementado com solução de gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolítica e lipolítica, por meio do aparecimento de um halo transparente com precipitados ao redor da colônia. Após a incubação a 36°C por 24 a 48 horas, as placas com característica positiva para o gênero são contadas e o resultado será expresso em UFC/g/mL (BRASIL, 2003).

A partir das colônias sugestivas de *Staphylococcus* sp., realizam-se provas de coloração de Gram, catalase e coagulase. Na coloração de Gram, colônias estafilocócicas vistas em óleo de imersão e aumento de 1000 vezes, apresentam-se em forma de cachos corados em roxo.

Para a prova de coagulase, inoculam-se de três a cinco colônias suspeitas, em 10 mL de caldo BHI, e incubam-se a 35°C por 24 horas. Em seguida, transferem-se 0,3 mL dos tubos do BHI para tubos estéreis contendo 0,3mL do plasma de coelho. Esses tubos devem ser incubados por 6 horas a 36°C em estufa. Os tubos positivos apresentam formação do coágulo pela inclinação suave do tubo em 90 graus da vertical (BRASIL, 2003).

Para a prova de catalase, retira-se com auxílio de uma alça de platina, o centro escuro de uma colônia suspeita, colocando-se em uma lâmina de vidro. Adiciona-se em seguida, uma gota do peróxido de hidrogênio a 3% sobre a colônia, que quando positivas formam borbulhas devido à liberação de oxigênio (BRASIL, 2003).

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das evidências de que a carne moída é um dos alimentos comumente envolvidos em surtos de DTAs, seu controle de qualidade é importante para a segurança alimentar e possibilita a adoção de medidas para a melhoria da qualidade do produto. Neste sentido, as técnicas de análises laboratoriais são ferramentas importantes para garantir a inocuidade da carne moída e prevenir doenças.

#### REFERÊNCIAS

ALCANTARA, M.; MORAIS, I. C. L.; MATOS, C.; SOUZA, O. C. Principais microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de higiene e Sanidade Animal**. v. 6, n. 1, 2012.

BAPTISTA, R. R. A. A. de.; MOURA, F. M. L. de.; FERNANDES, M. F. T. S.; SANTOS, V. V. M.; FERNANDES, E. F. F. T.S. Aspectos qualitativos da carne moída comercializada na região metropolitana do Recife-PE. **Acta Veterinária Brasílica**, v.7, n.1, p.38-47, 2013.

- BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; MONTEIRO, A. A.; BELOTI, V. Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 856-862, 2007.
- BRASIL. 2003. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa no 62, de 26 de agosto de 2003. **Dispõe sobre os métodos analíticos para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Diário Oficial da União, Brasília, 18 de setembro de 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União. 07 de 10 janeiro de 2001. Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 20, de 21 de julho de 1999**. Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes - Sal e Salmoura- SDA. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 09 de setembro de 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 40, de dezembro de 2005**. Métodos Analíticos, Isolamento e Identificação da *Salmonella* na carne bovina, avicultura e produtos derivados de ovos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 16 de dezembro de 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003. **Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne bovina em conserva e carne moída de bovino**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 24 de novembro de 2003.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2017.
- CAMILLA, H.; TRINDERUP, ANDERS. D.; KIRSTEN, J.; JENS, M. C.; KNUT, C. Comparison of a multispectral vision system and a colorimeter for the assessment of meat color. **Meat Science**, n.102, p.1-7, 2015.
- CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; ROSSI, D. A. Correlação entre métodos cromogênicos e o método convencional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 3, p. 278-286, 2008.
- CIROLINI, A.; BASEGGIO, A.M.; RAMOS, R.J.; SILVESTRA, H.da.S.; CATTANI, C.S.de. O.; VIEIRA, C.R.W. Avaliação do sistema Petrifilm™ HS na contagem de coliformes em leite pasteurizado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.73, n.3, p.298-301.
- CUNHA, M. A. DA; SILVA, M. R. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. **Saúde & Ambiente em Revista**, v.1, n.1, p.09-13, 2006.
- DAMER, J. R. da. S.; DILL, R. E.; GUSMÃO, A. A.; MORESCO, T. R. Contaminação de carne bovina moída por *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. **Revista Contexto & Saúde**. v.14, n.26, p. 20-27, 2014.
- FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT. M. A.; BURKHARDT, W. **Bacteriological Analytical Manual: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. 2002**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>>. Acesso em: 07 abr de 2017.
- FENG, P.; WEGANT, S.D.; JINNEMAN, K. **Diarrheagenic *Escherichia coli*. Bacteriological Analytical Manual**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm> Acesso em:06 de abr 2017.

- FERREIRA, A. M.; ANDRADE, D.; RIGOTTI, M. A.; ALMEIDA, M. T. G. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina em superfícies de uma Unidade de Terapia Intensiva. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 4, p. 6, 2011.
- FERREIRA, R; SIMM, E. M. Análise microbiológica da carne moída de um açougue da região central do município de Pará de Minas/MG. **SynThesis Revista Digital FAPAM**, v.3, n. 3, p. 37-61, 2012.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607 p.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.
- FUNG, D. Rapid methods and automation in microbiology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. n.1, v.1, p.3-22, 2002.
- GOMIDE, L.A.M.; RAMOS, E.M.; FONTES, P.R. **Ciência e Qualidade da Carne - Série Didática - Fundamentos**. Viçosa: Editora UFV. 2013. 197p.
- HANGUI, S.A.R.; FERREIRA, A.F.; DOURADO, A.T.S.; MARTINS, J.D.; VARGEM, D.S.; SILVA, J. R. Análise microbiológica da carne bovina moída comercializada na cidade de Anápolis, Goiás. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.12, n.2, p.30-38, 2015.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: IMESP, 2008. p.1020.
- JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 710-730, 2010.
- JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 711.
- JORIS, M.A.; VANROMPAY, D.; VERSTRAETE, K.; REU, K.; ZUTTER, L.; COX, E. Use of antibody responses against locus of enterocyte effacement (LEE) – Encoded antigens to monitor enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections on cattle farms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 79, n. 12. p. 3677-3683, 2013.
- JUSTÉ, A.; THOMMA, B.P.H.J.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and process. **Food Microbiology**. v.25, n.6, p.745-61, 2008.
- KORNACKI J. L.; JOHNSON J. L. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In:\_\_\_\_. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington DC: American Public Health Association, 2001. Cap. 8, p. 69-82.
- LEOTTA, G.A.; BRUSA, V.; GALLI, L.; ADRIANI, C.; LINARES.L.; ETCHEVERRÍA, A.; SANZ, M.; SUCARI, A.; GARCÍA, P. P.; SIGNORINI.M. Comprehensive Evaluation and Implementation of Improvement Actions in Butcher Shops. **Plos One**. v. 11, n. 9, p. 16, 2016.
- MANGEN, M. J.; BOUWKNEGT, M.; FRIESEMA, I. H. M.; HAAGSMA, J. A.; KORTBEEK, L. M.; TARIQ, L.; WILSON, M.; PELT, W.V.; HAVELAAR, A. H. Cost-of-illness and disease burden of food-related pathogens in the Netherlands 2011. **International Journal of Food Microbiology**. v.196, n. 2, p. 84-93, 2015.
- MARCHI, P.G.F.; JUNIOR, O.D.R.; CERESER, N.D.; SOUZA, V.; LAO, N.C.M.R.; FARIA, A.A. Avaliação microbiológica e físico-química da carne bovina moída comercializada em supermercado e açougues de Jaboticabal-SP. **Revista Eletrônica da Univar**, v.1, n.7, 2012.

- MARTINS, S. C. S.; FIÚZA, L. M. C.G.; MARTINS, C. M. Comparação de diferentes meios de cultivo para a avaliação da viabilidade celular de fermentos biológicos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 2478, 2013.
- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n. 1, p. 89-99, 2010.
- MENDONÇA, C. R.; GRANADA, G. Coliformes em açougues de Pelotas-RS. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 5, n. 1, 2012.
- MESQUITA, M. O. de.; VALENTE, T. P.; ZIMMERMANN, A.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Qualidade físico-químico da carne bovina *in natura* aprovada na recepção de restaurante industrial. **Revista vigilância em debate**, v. 2, n. 3, p. 103-108, 2014.
- NASCIMENTO, M.V.D.; UEDES, A. T. L.; SILVA, H. A.; SANTOS, V. E. P.; PAZ, M. C. F. Avaliação microbiológica da carne moída fresca comercializada no mercado central em Campina Grande-PB. **Revista Saúde e Ciência**, v. 3, n. 1, p. 56-68, 2014.
- OBESO, J. M.; GARCIA, P.; MARTÍNEZ, B.; ARROYO-LOPEZ, F.N.; GARRIDO-FERNANDEZ, A.; RODRIGUEZI, A. Use of logistic regression for prediction of the fate of *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk in the presence of two lytic phages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6038-6046, 2010.
- OLIVEIRA, F. B.; MIRANDA, A.S.; VIANA JÚNIOR, N.M.; SANTANA, R. F. Qualidade microbiológica de farinhas de linhaça dourada e marrom. **UNOPAR: Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 17, n. 3, p. 176-80, 2015.
- PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. Goiânia: UFG, v. 1, 2006, p. 592.
- PINHEIRO, F.A.; CARDOSO, W.S.; CHAVES, K.F.; OLIVEIRA, A.S.B.; RIOS, S.A. Perfil de consumidores em relação à qualidade de alimentos e hábitos de compras. **UNOPAR: Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 2, p. 95-102, 2011.
- R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4 ed. São Paulo: Varela, 2010. 624p.
- RODRIGUES, M. X.; BITTENCOURT, J. V. M.; MATOS, E. A. S. A.; REIS, D. R. Inovação em métodos analíticos microbiológicos na indústria alimentícia. **Latin American Journal of Business Management**. v. 2, n. 2, p. 54-81, 2011.
- ROSINA, A.; MONEGO, F. Avaliação microbiológica da carne bovina moída nas redes de supermercados de Canoinhas-SC. **Revista Interdisciplinar**, v. 2, n. 2, p. 55-64, 2013.
- SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V. ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M. B. O. C. Estafilococos em alimentos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.
- SILVA JR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviço de alimentação**. 6 ed. São Paulo. Varela, 2007. 624 p.
- SILVA JUNIOR, E. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 6 ed. São Paulo: Varela; 2013.
- SILVA, B. O.; CARAVIELLO, S. Z.; RODRIGUES, A. C.; RUEGG, P. L. Evaluation of Petrifilm for the Isolation of *Staphylococcus aureus* from Milk Samples. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3000-3008, 2005.

- SILVA, J.S.; FURTADO, S. C. Análise físico-química da carne moída comercializada na zona sul de Manaus-AM. **Revista Científica da Fаметro**, v.1, n.1, p. 11, 2016.
- SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 352-359, 2006.
- SILVA, N. da.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Varela, 2007. 536 p.
- SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, SILVA, R. R. L.; GOUVEIA, D. S.; ROCHA, A. P. T.; ARAUJO, A. S. Análise de coliformes e verificação das Boas Práticas de Fabricação de carne moída comercializada na cidade de Campina Grande-PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.10, n. 1, p.115-119, 2015.
- SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, n.9, v.1, p.83-88, 2006.
- TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.
- VELHO, A. L. M. C. S.; ABRANTES, M. R.; MEDEIROS, J. M. S.; AGUIAR, K. C. S.; SOUSA, E. S.; SOARES, K. M. P.; SILVA, J. B. A. Avaliação qualitativa da carne bovina in natura comercializada em Mossoró-RN. **Acta Veterinária Brasília**, v. 9, n. 3, p. 212-217, 2015.
- VIPHAM, J. L.; BRASHEARS, M. M.; LONERAGAN, G. H.; ECHEVERRY.A.; BROOKS, J.C.; CHANEY, W. E.; MILLIR, M. F. Salmonella and Campylobacter baseline in retail ground beef and whole-muscle cuts purchased during 2010 in the United States. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 12, p. 2110-2115, 2012.
- WARNER, R. D.; GREENWOOD, P. L.; PETHICK, D. W.; FERGUSON, D. M. Genetic and environmental effects on meat quality. **Meat Science**, Savoy, v. 86, n. 1, p. 171-183, 2010.

## USO DE SILAGEM DE GRÃO ÚMIDO DE MILHO NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE

### **Kárito Augusto Pereira**

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Departamento de Zootecnia. Diamantina - Minas Gerais.

### **Renata Vaz Ribeiro**

Universidade Federal de Goiás (UFG). Escola de Veterinária e Zootecnia. Goiânia- Goiás.

### **Otávio Augusto Martins Oliveira**

Universidade Estadual de Goiás (UEG). Departamento de Zootecnia. São Luís de Montes Belos- Goiás.

### **Thais Marques Santana**

Universidade Estadual de Goiás (UEG). Departamento de Zootecnia. São Luís de Montes Belos- Goiás.

### **Alliny das Graças Amaral**

Universidade Estadual de Goiás (UEG). Departamento de Zootecnia. São Luís de Montes Belos- Goiás.

### **Natalia de Avila Soares**

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Departamento de Zootecnia. Diamantina - Minas Gerais.

### **Mariane Rodrigues Ferreira**

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Departamento de Zootecnia. Diamantina - Minas Gerais.

de silagem de grão úmido de milho referentes à bovinocultura de corte. Demonstrando as perspectivas de produção e importância que o milho representa para a alimentação animal. Com uma crescente demanda na produção de milho a fim de atender as necessidades do crescimento de sistemas de confinamentos, somam fatores que contribuem com maior importância na utilização de grãos na elaboração de dietas na bovinocultura, sendo considerado como a principal fonte de energia em dietas de bovinos de corte. Visto que o cenário da produção de carne bovina se torna cada vez mais competitivo, demonstrando sua eficiência na digestibilidade e elevando os índices de produção, apresentando resultados satisfatórios referentes à eficiência alimentar e composição da carcaça como força de cisalhamento, pH, cor, maciez sensorial, suculência e sabor da carne e aumento no teor de lipídios na carne dos animais que recebem dietas de silagem de grão úmido de milho, além de reduzir o dispêndio no transporte e armazenamento, concentrando a operação de moagem. Assim, a presente revisão versa sobre a viabilidade da utilização da silagem de grão úmido de milho, por se tratar de umas das poucas práticas que consegue reunir baixos custos em relação a silagem de milho convencional, aliada a

**RESUMO:** Objetivou-se, por meio do presente trabalho, reunir aporte teórico, via revisão da literatura, sob alguns parâmetros na utilização

elevada qualidade nutricional, sobretudo com alta resposta animal, com o objetivo de maximizar a digestibilidade do amido, sendo esta a característica de maior evidência.

**PALAVRAS-CHAVE:** alimentação animal, bovinos, digestibilidade, ensilagem

## USE OF CORN DAM GRAIN SILAGE FOR FOOD CATTLE

**ABSTRACT:** The objective of this study was to present a theoretical contribution, through a review of the literature, under some parameters in the use of corn silage for beef cattle. Demonstrating the production prospects and importance that maize represents for animal feed. With a growing demand for maize production in order to meet the needs of the growth of feedlot systems, there are factors that contribute with greater importance in the use of grains in the elaboration of diets in the bovinocultura, being considered as the main source of energy in diets of beef cattle. As the beef production scenario becomes increasingly competitive, demonstrating its efficiency in the digestibility and raising production rates, presenting satisfactory results regarding feed efficiency and carcass composition as shear force, pH, color, sensorial softness, succulence and taste of the meat and increase in the lipid content in the meat of the animals receiving diets of corn grain silage, besides reducing the transport and storage expenses, concentrating the grinding operation. Thus, the present review deals with the feasibility of using corn silage, because it is one of the few practices that can achieve low costs in relation to conventional corn silage, combined with high nutritional quality, especially with a high response rate with the objective of maximizing the digestibility of the starch, being this the characteristic of greater evidence.

**KEYWORDS:** animal feed, cattle, digestibility, silage

### 1 | INTRODUÇÃO

Com a globalização do mercado, a pecuária vem sofrendo profundas modificações com o objetivo de atingir índices zootécnicos mais eficientes. O mercado consumidor por sua vez, está mais exigente e vem pressionando os produtores a adotarem medidas de controle de qualidade e eficiência na produção de alimentos em todas as fases da bovinocultura de corte (SANTOS et al., 2014).

Diante da necessidade, para se chegar a desejados índices zootécnicos, é imperativo a utilização de grãos, os quais em geral representam grande importância na alimentação de bovinos. Entretanto, é imperativo que o amido presente no grão esteja mais disponível para a digestão e aproveitamento do animal. Essa disponibilidade pode ser melhorada através de processamentos físico-químicos, nessa conjuntura destacando-se a ensilagem dos grãos úmidos de milho como uma tecnologia eficiente (TEODORO et al., 2012).

Assim, a silagem de grão úmido de milho tem sido utilizada para solucionar

problemas de armazenamento de matérias-primas nas propriedades rurais, melhorando tanto o valor nutricional deste alimento, bem como a redução do grau de contaminação das dietas dos animais.

Ressalva que esse tipo de silagem apresenta diversas finalidades em sistemas de criação animal, e pode ser encontrado em proporções significativas em alimentos concentrados para bovinos, a fim de suprir a energia digestível suficiente objetivando melhores resultados e desempenho (PEREIRA, 2012). Uma vez que, a participação de alimentos concentrados nas formulações de dietas de bovinos aumentou consideravelmente no Brasil (PAULINHO et al., 2013).

Do mesmo modo, como na confecção da silagem de milho, utilizando a planta inteira, os mesmos cuidados são essenciais para o processamento da ensilagem de grãos para preservar a qualidade do grão úmido (LUGÃO et al., 2011). Outros cuidados a serem intensificados bem como a prevenção de roedores no armazenamento dos grãos são essenciais a dietas dos animais, pois, além dos riscos de contaminação as perdas na estocagem são extremamente consideráveis, elevando os custos na produção.

Objetivou-se, por meio do presente trabalho, reunir aporte teórico, via revisão da literatura, referente à alguns parâmetros na utilização de silagem de grão úmido de milho na bovinocultura corte.

## 2 | ESTIMATIVAS E PERSPECTIVAS SOBRE O MILHO GRÃO NO BRASIL

O milho é o cereal de maior volume de produção no mundo, com aproximadamente 960 milhões de toneladas, Estados Unidos, China, Brasil e Argentina são os maiores produtores do produto, representando 70% da produção mundial. O milho no Brasil representa uma área agrícola de 60 milhões de hectares, ocupando 7% do total de terras brasileiras, estimado em 851 milhões de hectares, aproximadamente 5,5 milhões de imóveis rurais, sendo considerado um país estratégico, pois, é o terceiro maior produtor e o segundo maior exportador mundial de milho, se tornando um país de grande importância dentro do cenário agrícola mundial, como identifica-se através da Tabela 1 (PEIXOTO, 2014).

Regiões	Área (em mil ha)		Produtividade (em kg/ha)		Produção (em mil t)	
	Safra 14/15	Safra 15/16	Safra 14/15	Safra 15/16	Safra 14/15	Safra 15/16
Norte	393,5	385,1	3.240	3.223	1.274,7	1.240,9
Nordeste	2.059,9	2.002,3	2.169	2.058	4.468,8	4.119,9
Centro-Oeste	361,6	325,5	7.054	7.556	2.550,9	2.459,4
Sudeste	1.434,5	1.395,1	5.437	5.787	7.799,8	8.073,1

Sul	1.985,2	1985,9	7.373	7.048	14.637,2	12.587,1
Brasil	6.234,7	5.893,7	4.929	4.832	30.731,4	28.480,4

Tabela 1. Comparativo de área, produtividade e produção – milho primeira safra no Brasil.

Fonte: Conab, (2015).

Informações compiladas pelo MAPA (2013), o consumo interno de milho em 2013 representou 66,7% da produção, e deve continuar nos próximos anos para 66,9%, a fim de manter o consumo interno projetado de 62,6 milhões de toneladas e garantir um volume razoável de estoques finais e o nível de exportações projetado como ocorreu em 2015 que superou 2014, estima-se uma projeção de 93 milhões de toneladas atendera a demanda em 2023 (CONAB, 2015).

Nesse ótica, espera-se do Brasil um crescimento de 2,67% ao ano nos próximos anos na produção de milho, com aumento de 0,73% da área plantada. Vários estudos e projeções realizados pela Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) indicam aumento de 19,11 milhões de toneladas entre a safra de 2008/2009 e 2019/2020. Estima-se que na safra de 2019/2020, a produção deverá ficar em 70,12 milhões de toneladas e o consumo em 56,20 milhões de toneladas (MAPA, 2013).

Todavia, o milho grão apresentará desafios na produção, com uma população mundial de 7 bilhões de pessoas, em que 2050 superará 9 bilhões, o milho será ainda o mais importante dentro desta estratégia. Pois, a demanda por alimentos crescerá 20% nos próximos 10 anos, e o Brasil será responsável por atender 40% desta demanda. Além de outros desafios como a escassez de terras, variações climáticas, tornando cada vez mais necessário o uso de tecnologia e de práticas de manejo que permitam colher mais por área a fim de aumentar a produtividade (PEIXOTO, 2014).

### 3 | UTILIZAÇÃO DA SILAGEM DE GRÃO ÚMIDO DE MILHOS NA BOVINOCULTURA DE CORTE

Bovinos confinados alimentados com dietas a base de grãos possuem certa instabilidade na população microbiana, devido às variações na produção de ácidos graxos voláteis (AGV), diminuição do poder tamponante do rúmex, visto que há menos mastigação e produção de maiores níveis de propionato e butirato (GOBETTI et al., 2013).

LUNDY et al. (2015) demonstram que a rápida fermentação de milho finamente moído em grande parte contribui para o risco de acidose em dietas ricas em grãos, prejudicando o desempenho de bovinos com redução do ganho médio diário.

Todavia, faz-se necessário a moagem adequada de milho em dietas com baixa e alta inclusão desse alimento, com necessidade da avaliação de dietas com mais de 35% de grãos úmido ou menos do que 45% de grãos de milho na dieta. Entretanto, a digestibilidade do amido para bovinos alimentados com milho finamente moído é mais favorável, devido ao aumento da disponibilidade do amido no rúmen permitindo aos animais confinados melhor desempenho.

BIAGGIONI et al. (2009) demonstraram que o pH ideal da silagem deve estar na faixa de 3,8 a 4,2. Com a finalidade de se obter a melhor qualidade da silagem de grão úmido deve-se manter temperatura interna de 20/30 °C, resultando em menor produção de ácido acético. Já na ausência de pressão, 25 °C apresenta as melhores condições em relação a qualidade final do produto, portanto, quando bem manipulado resulta em aspectos positivos referentes a utilização dessa tecnologia.

Mesmo assim, com o preço da saca de milho oscilando todos os anos, todo e qualquer produtor que tenha em sua propriedade a criação de animais em que o milho apareça como um ingrediente importante da alimentação, deve-se conhecer as vantagens da silagem de grão úmido. É, talvez, uma das poucas práticas que consegue reunir baixos custos com elevada qualidade nutricional ao longo do tempo de armazenamento, e alta resposta animal (LOPES, 2015).

IGARASI et al. (2008) em experimento com bezerros machos inteiros F1 Red Angus x Nelore, em confinamento recebendo dieta total com silagem de grão úmido de milho, como ingrediente energético principal, salientam esse tipo de processamento não altera as características físico-químicas de carcaças e maciez de carne.

Do mesmo modo, reafirmando os resultados encontrados por HENRIQUE et al. (2007) em que bovinos jovens submetidos a confinamento a base de silagem do grão úmido se mostra mais vantajosa, pois melhora 9,7% a eficiência alimentar, mas não alterou as características de composição da carcaça, como encontra-se na Tabela 2.

Características da carcaça	Dietas			
	Si-MU	Si-MS	Ba-MU	Ba-MS
Peso da carcaça quente, kg	256,0	257,6	242,3	231,3
Rendimento de carcaça, %	56,88	57,63	55,57	54,69
Espessura de gordura, mm	7,83	8,36	7,28	5,57
Área de olho de lombo, cm <sup>2</sup>	62,90	64,52	60,09	61,03
Área de olho de lombo, cm <sup>2</sup> /100 kg/carcaça	24,57	25,05	24,80	26,39

Peso do fígado, kg	6,21	5,73	5,83	5,20
Peso dos rins, kg	1,03	1,06	0,90	0,98
Gordura renal-pélvica-inguinal, kg	8,06	8,26	6,67	6,71

Tabela 2. Características da carcaça dos animais em cada tratamento.

Si - silagem de milho, MU - milho úmido, MS - milho seco, Ba - bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: HENRIQUE et al. (2007)

SILVA et al. (2007) reportam que animais quando alimentados com dietas constituídas a partir de grãos úmidos de milho apresentam melhor eficiência alimentar (0,160) em comparação a animais alimentados com milho moído (0,133), em experimentação utilizando moagem e ensilagem de grãos úmido de milho em dietas para bovinos nelores confinados.

Já CAETANO (2012) obteve resultando mais elevados trabalhando com o efeito do processamento do milho e dos teores de fibra no desempenho de bovinos nelore em terminação, quando utilizou silagem de grão úmido de milho obteve maior eficiência alimentar no rendimento de carcaça, quando comparado com milho moído fino, apresentando 0,145 vs. 0,130 respectivamente. Além dos resultados de desempenho de 13,9% superior em relação ao fornecimento de dietas de milho seco moído fino com 0,172 vs. 0,151 kg/kg respectivamente.

De acordo com PASSINI et al. (2002), a silagem de grão úmido de milho apresenta resultados satisfatórios quando adicionada em dietas de terminação em bovinos jovens confinados, visto que não prejudica o desempenho animal, melhora as características de rendimento da carcaça e qualidade da carne, os níveis de 14% de PB na fase inicial podem ser reduzidos para 11% na fase de terminação sem prejudicar a carcaça ou a qualidade da carne.

PORTELLA e ALVES (2002) trabalhando com sistemas de produção mais especializados com engorda de novilhos para o abate precoce em condições de pastejo, no terço final exige alta suplementação energética, que pode ser obtida através da silagem de grão úmido, tornando uma excelente alternativa para uso permanente em ganho em peso e acabamento de carcaça, sobretudo consideráveis reduções no dispendio por quilo da suplementação alimentar foram obtidos com a adição do grão úmido de milho.

BIAGGIONI et al. (2009) reportam que o uso da silagem de grão úmido de milho na alimentação de bovinos, há redução no consumo, pois o processamento (quebra do grão no processo de ensilagem) contribui para aumentar a disponibilidade e digestibilidade do amido no grão de milho, assim o animal consegue atender suas necessidades de energia a partir de uma menor ingestão de grãos expressando

o mesmo desempenho animal. Entretanto observa-se ganhos significativos em relação a melhoria da eficiência alimentar, cerca de 9 e 25%, obtendo resultando ainda mais consistentes em relação a conversão alimentar.

Segundo GREGÓRIO (2014), para se obter a mesma digestibilidade na suplementação de bovinos em confinamento é necessário fornecer menos quantidades quando se utiliza o grão úmido de milho em comparação ao grão seco. Ressaltando que a partir da utilização dessa prática a digestibilidade se torna mais eficiente e conseqüentemente aumento a conversão alimentar. A adoção do grão úmido também reduz os custos operacionais no confinamento, pois o grão úmido vai direto para o silo trincheira, dispensando a necessidade da secadora, assim, cada tonelada sai por R\$ 320,00, representando um investimento de 5 a 10% de economia em relação a utilização do grão seco.

LOPES (2015) é ainda mais otimista, quando diz que a silagem de grão úmido de milho é uma técnica que vem apresentando acentuado crescimento em quase todas as regiões produtoras de milho do Brasil, com acentuada redução de custos na alimentação de bovinos de corte que pode chegar de 20 a 30%, a partir de um consumo médio de 2,5 kg de grão úmido/cab/dia.

Assim como a utilização do grão úmido de milho à possibilidade de utilizar apenas um alimento e um concentrado para bovinos de corte, com redução nos gastos com produção de volumosos, mão-de-obra, infra-estrutura, entre outros; ainda obter alta eficiência biológica comprovada, resultando em maior relação de arrobas produzidas com menor consumo da dieta. Mas deve-se atentar as variações na eficiência alimentar de acordo com a categoria animal utilizada, uma vez que a eficiência de transformação do alimento consumido em ganho de peso decresce, à medida que avança a idade dos animais (SCHALCH JR *et al.*, 2012).

Em níveis de 6-12% de volumoso, indicam que pode ser substituída com sucesso em relação a Fibra em Detergente Neutro (FDN) em dietas contendo 30% de grão úmido de milho com base da Matéria Seca (MS) em terminação de bovinos, sem quaisquer efeitos prejudiciais sobre desempenho dos animais (BENTON *et al.*, 2007).

Tendo em vista que bovinos alimentados com silagem de grão úmido de milho apresentam maior peso de rúmen, quando comparado a alimentação de milho seco moído fino (10,04 vs. 9,53 kg respectivamente) (CAETANO, 2012).

Do mesmo modo, HENRIQUE *et al.* (2007), observaram maior peso de fígado em bovinos alimentados com silagem de grão úmido de milho quando comparado ao fornecimento de milho moído seco fino.

Mesmo com riscos eminentes de desordens ruminais quando fornecido elevadas concentrações de amido, com o uso da silagem de grão úmido de milho há quatro vezes menos teor de amido fecal, quando comparado ao uso do milho seco

moído com 2,96 vs. 13,22% na MS respectivamente, devido a maior facilidade do grão em ser absorvido pelas bactérias ruminais, ou seja, há melhor aproveitamento, assim menores quantidades de grão úmido chegam até o intestino para ser digerido. O pH fecal também se torna mais ácido quando se utiliza o grão úmido em relação ao milho grão seco moído fino sugerindo também menor passagem de amido para o intestino com 7,02 vs. 6,57, respectivamente (CAETANO, 2012).

Em relação à extensão da digestão do amido, PAULINHO et al. (2013) compararam formas de processamento de amido, e salientaram que o milho inteiro pode apresentar digestibilidade inferior pós-rúmen, assim como o milho moído a seco quanto as digestibilidades ruminal e total, ao contrário da floculação e da silagem de grão úmido que apresentam os mais elevados índices de digestibilidade ruminal, como identifica-se na Tabela 3.

Grãos	Tipos de processamento	Rúmen	Pós-Rúmen	Total
Milho	Milho seco	68.3 <sup>b</sup>	71.2 <sup>b</sup>	92.5 <sup>b</sup>
	Silagem de Grão úmido	77.5 <sup>a</sup>	87.2 <sup>a</sup>	98.1 <sup>a</sup>
	Floculado	83.9 <sup>a</sup>	93.9 <sup>a</sup>	99.1 <sup>a</sup>
	Inteiro	78.1 <sup>b</sup>	57.8 <sup>c</sup>	90.8 <sup>b</sup>

Tabela 3. Influência da forma de processamento sobre a extensão da digestão de amido de milho, em função da quantidade de amido que atingiu cada compartimento (rúmen, pós-rúmen).

Fonte: Adaptado de Owens & Basalan (2013).

OWENS e BASALAN (2013) também trabalhando com relação da digestão do amido em bovinos em confinamento, apresentam valores de 78.1, 57.8 e 90.8% para digestibilidade ruminal, pós-ruminal e total, respectivamente, para o grão de milho fornecido inteiro, demonstrando a grande quantidade de milho que chega ao intestino para ser absorvida, resultando em aumento na taxa de passagem e menor absorção amido pelo animal.

Do mesmo modo BENTON et al. (2007), trabalhando com dietas a base de mistura de milho laminado e grão úmido de milho ensilado a partir de diferentes inclusões de volumoso na dieta total contendo 0, 4 e 8% na MS, obtiveram resultados de novilhas quando não alimentadas com volumoso procedendo em menor consumo de matéria seca, menor ganho peso e menor ganho de peso vivo final, sobretudo menor rendimento de carcaça e espessura de gordura subcutânea, demonstrando a importância e necessidade da utilização do simultânea do volumoso e concentrado.

Segundo PERDIGÃO (2014), avaliando bovinos Nelore machos não castrados confinados a partir dos efeitos da duração de protocolos de adaptação a rações de alto teor concentrado do qual era constituído por silagem de grão úmido de milho sobre o comportamento ingestivo, desempenho, características de carcaça e saúde

ruminal, identificaram que os animais que receberam alto teor de concentrado, há necessidade de protocolos gradativos na adaptação, pelo melhor resultado no comportamento ingestivo e maior ganho de peso diário, com duração de nove dias em função de apresentar menores lesões ruminais e menor atividade ploriferativa do epitélio ruminal na terminação.

CAETANO (2012) analisando o efeito de quatro métodos de processamento de milho (floculado, ensilagem de grão úmido, moagem e laminação a seco) com duas inclusões de bagaço de cana de açúcar sendo constituídas de 12 a 20% de MS da ração total, identificou maior ganho de peso, melhor valor da energia líquida referente ao fornecimento do milho floculado e a ensilagem de grão úmido de milho, apresentando também os melhores processamento para bovinos Nelore em estado de terminação.

Segundo RIZZO (2013), em estudo com o efeito do teor de fibra e do processamento de grão úmido ensilado e grão seco moído fino na qualidade e perfil de ácidos graxos da carne de bovinos Nelore de dois a três anos de idade confinados, identificaram que não houve efeito do processo de ensilagem do grão úmido de milho ou dos diferentes níveis de fibra sobre a umidade, força de cisalhamento, pH, cor, maciez sensorial, suculência e sabor da carne. Entretanto, houve um aumento no teor de lipídios na carne dos animais que receberam dietas de silagem de grão úmido de milho. Sobretudo, o aumento no teor de fibra insolúvel em detergente neutro proveniente da forragem (FDNf) na dieta resultou em menor relação  $\omega 6:\omega 3$  na carne, algo desejável sob o ponto de vista da saúde do consumidor.

Entretanto, antes da escolha da alimentação a ser oferecida no confinamento, deve-se atentar ao tipo racial dos animais que serão suplementados com determinada dieta contendo alta inclusão de concentrado, pois, geralmente animais *Bos Indicus* apresentam desempenho inferior a bovinos cruzados ou *Bos taurus*, assim, aumentar a degradabilidade do amido pode tornar-se uma media bastante eficiente através da utilização da silagem de grão úmido de milho, considerando que essa pratica apresenta elevados índices de degradabilidade ruminal (MARCONDES *et al.*, 2011).

CAETANO (2012) avaliando a eficiência da energia metabolizável da ensilagem do grão úmido de milho em comparação com milho seco moído para bovinos Nelore em fase de terminação, identificou que os animais quando alimentados com grão úmido apresentaram eficiência da energia metabolizável 17,9% superior ao grão seco moído, com 60,40 e 51,23 g PV/kg respectivamente, demonstrando a superioridade em fornecer energia aos animais a partir da silagem de grão úmido de milho.

## 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente revisão versa sobre a viabilidade da utilização da silagem de grão úmido de milho, por se tratar de umas das poucas práticas que consegue reunir baixos custos em relação à silagem de milho convencional, aliada à elevada qualidade nutricional, sobretudo com alta resposta animal. Mesmo com as dificuldades de processamento e cuidados no armazenamento, sendo esta uma etapa fundamental na qualidade do produto a ser utilizado. Do mesmo modo, o produtor deve-se considerar o processamento a ser empregado a fim de se obter a melhor viabilidade em relação ao aproveitamento pelos animais, sempre com o objetivo de maximizar a digestibilidade do amido, sendo esta a característica de maior evidência.

## REFERÊNCIAS

- BENTON, J.R. et al. 2007. **Effects of roughage source and level with the inclusion of wt distillers grains on finishing cattle performance and economics.** Nebraska Beef Report, Lincoln, p.29-32, 2007.
- BIAGGIONI, M.A.M.; LOPES, A.B. de C.; JASPER, S.P.; BERTO, D.A.; GONÇALVES, E.V. 2009. **Qualidade da silagem de grão úmido em função da temperatura ambiente e pressão interna de armazenagem.** Acta Scientiarum. Maringá, 31(3): 377-382.
- CAETANO, M. 2012. **Efeito do processamento do milho e dos teores de fibra no desempenho de bovinos Nelore em terminação.** Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz. Piracicaba, p.126.
- Companhia de Abastecimento do Ministério da Agricultura (CONAB). 2018. **Acompanhamento da Safra Brasileira - Grãos.** Safra 2017/18. Primeiro Levantamento, 5(4):1-126.
- GREGORIO, M. 2014. **Grão Úmido de Milho oferece boa Digestibilidade e Rendimento.** Disponível em: <http://www.canalrural.com.br/noticias/pecuaria/grao-umido-milho-oferece-boa-digestibilidade-rendimento-8365>. Acesso em: 11/06/2019.
- GOBETTI, S.T.C.; 2013. **Utilização de silagem de grão úmido na dieta de animais ruminantes.** Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais. Guarapuava (PR), 9(1): 225-239.
- HENRIQUE W et al. 2007. **Avaliação da silagem de grão de milho úmido com diferentes volumosos para tourinhos em terminação: Desempenho e características de carcaça.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.36, n.1, p.183-190.
- IGARASI, M.S.; NEUMANN, M.; OLIBONI, R.; OLIVEIRA, M.R. 2008. **Características de carcaça e parâmetros de qualidade de carne de bovinos jovens alimentados com grãos úmidos de milho ou sorgo.** Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, 37(3): 550-528.
- LOPES, J. 2015. **Silagem de Grão Úmido de Milho.** Fornecido por Joomla!. Disponível em: <http://www.vistagaucha-rs.com.br/site/index.php/99-noticias/510-silagem-de-grao-umido-de-milho>. Acesso em: 15/07/2019.
- LUGÃO, S.M.B.; BETT, V.; MORO, V.; LANÇANOVA, J.A.C. 2011. **Silagem de milho de planta inteira.** In: Kiyota, N.; Vieira, J.A.N.; Yagi, R.; Lugão, S.M.B. Silagem de milho na atividade leiteira do sudoeste do Paraná: do manejo do solo e de seus nutrientes à ensilagem de planta inteira e grãos úmidos. Londrina: IAPAR, p.47-42.

LUNDY, E.L.; DORAN, B.E.; VERMEER, E.; LOY, D.D.; HANSEN, S.L. 2015. **Influence of Corn Particle Size on Steer Performance and Carcass Characteristics When Fed Diets with Moderate Inclusions of Wet Distillers Grains plus Solubles**. Animal Industry Report. Iowa State University Animal Industry Report.

MARCONDES, M.I.; VALADARES FILHO, S.C.; OLIVEIRA, I.M.; PAULINO, P.V.R.; VALADARES, R.F.D.; DETMANN, E. 2011. **Eficiência alimentar de bovinos puros e mestiços recebendo alto ou baixo nível de concentrado**. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, 40(6): 1313-1324.

Ministérios da Agricultura abastecimento e pecuária - (MAPA). 2013. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023**. Projeções de longo prazo. Brasília: Mapa/ACS, 2013. 4ª edição. p.96.

OWENS, F.; BASALAN, M. 2013. **Grain processing: gain and efficiency responses by feedlot cattle**. In: Plains Nutrition Council Spring Conference. Proceedings... p.76-100.

PASSINI, R.; SILVEIRA, A.C.; TITTO, E.A.L.; RODRIGUES, P.H.M.; ARRIGONI, M. De B.; COSTA, C.; CHARDULO, L.A.L. 2002. **Silagem de grãos úmidos de milho e de sorgo e níveis protéicos sobre desempenho e características da carcaça de novilhos superprecoces**. Maringá, Acta Scientiarum. 24(4): 1147-1154.

PAULINHO, P.V.R. et al. 2013. **Diets Sem Forragem para Terminação de Animais Ruminantes**. Revista Científica de Produção Animal, 15(2): 161-172.

PEIXOTO, C.M. 2014. **O milho no Brasil, sua importância e evolução**. Disponível em: <http://www.pioneirasementes.com.br/media-center/artigos/165/o-milho-no-brasil-sua-importancia-e-evolucao>. Acesso em: 21/10/2015.

PERDIGÃO, A. 2014. **Protocolos de adaptação a rações de alto teor de concentrados para bovinos Nelore confinados**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista - Câmpus de Botucatu, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu – SP.

PEREIRA, M.L.R. 2012. **Degradabilidade ruminal *In Vitro* de grão reidratado e ensilado de milho e sorgo com diferentes granulometrias**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás – Escola de Veterinária e Zootecnia. Goiânia.

PORTELLA, J.S.; ALVES, S.R.S. 2002. **Silagem Ácida de Milho com Grão Úmido para Gado de Corte**. Circular Técnico 24. Bajé RS. Embrapa Pecuária Sul.

RIZZO, P.M. 2013. **Efeito do teor de fibra e do processamento de milho na qualidade e perfil de ácidos graxos da carne de bovinos Nelore**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba.

SANTOS, M.C.; BELIK, W.; ZEN, S. de; ALMEIDA, L.H. de. 2014. **A rentabilidade da pecuária de corte no Brasil**. Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, p.505-517.

SCHALCH, J.R.F.J. 2012. **Terminação de bovinos confinados com dieta de milho grão inteiro**. Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/terminacao-de-bovinos-confinados-com-dieta-de-milho-grao-inteiro/>. Acesso em: 14/07/2019.

SILVA, S.L.; LEME, P.R.; PUTRINO, S.M.; VALINOTE, A.C.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LANNA, D.P.D. 2007. **Milho grão seco ou úmido com sais de calico de ácido graxos para novilhos Nelore em confinamento**. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, 36(5):1426-1434.

TEODORO, A.L.; VARGAS JUNIOR, F.M.; OLIVEIRA, M.V.M.; LONGO, M.L.; RUFINO JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, T.A.G. 2012. **Grão úmido na alimentação animal: estudo metanalítico**. PUBVET, Londrina, 6(4), ed.191, Art. 1283.

## SOBRE OS ORGANIZADORES

**ALÉCIO MATOS PEREIRA:** Possui graduação em Medicina Veterinária (2004), Mestrado (2008) e Doutorado (2014) em Ciência Animal (área de concentração em Reprodução Animal) pela Universidade Federal do Piauí. Atualmente é Professor da Universidade Federal do Maranhão, Campus IV, da disciplina de Anatomia e Fisiologia, nos cursos de Zootecnia, Agronomia e Biologia. Tem experiência na área de Medicina Veterinária e Zootecnia, com ênfase em endocrinologia e piscicultura. E-mail para contato: [aleciomatos@gmail.com](mailto:aleciomatos@gmail.com) Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2057530058619654>

**TAIRON PANNUNZIO DIAS E SILVA:** Possui graduação em Medicina Veterinária (2011), Mestrado em Zootecnia (2013) pela Universidade Federal do Piauí e Doutorado em Ciências (2017) pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Universidade de São Paulo. Atualmente é Técnico Administrativo em educação – Técnico em Agropecuária da Universidade Federal do Piauí. Tem experiência nas áreas de Medicina Veterinária e Zootecnia, com ênfase em produção e nutrição de ruminantes. Atua no estudo da interação nutrição x parasitologia utilizando radioisótopos como traçadores, bem como, no estudo da bioquímica metabólica sanguínea, bioclimatologia e comportamento animal. E-mail para contato: [tairon.mvet@gmail.com](mailto:tairon.mvet@gmail.com) com Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3370299560028662>

**SARA SILVA REIS:** Possui graduação em Zootecnia pela Universidade Federal do Maranhão (2019). Mestranda em Ciência Animal pelo Programa de Pós graduação PPGCA pela Universidade Federal do Maranhão - Campus IV. Tem experiência na área de Zootecnia, com ênfase em Zootecnia. E-mail para contato: [sara.reis652@gmail.com](mailto:sara.reis652@gmail.com) Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9200770549379851>

## ÍNDICE REMISSIVO

### ELEMENTO QUÍMICO

1,25-dihidroxitamina-D3-glicosídeo 39, 41, 45, 46, 47

#### A

Alimentação animal 83, 84, 93

Alimentação de bovinos 83, 84, 88, 89

Anatomia animal 23, 25

Avaliação da qualidade 48, 61, 63

#### B

Bovinos 60, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93

Bovinos de corte 83, 89

#### C

Camundongos swiss 10, 11

Características ósseas 39, 47, 48

Caracterização fenotípica 51

Carne moída 61, 62, 63, 65, 66, 67, 69, 73, 74, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 82

Codornas japonesas 39, 41, 44, 45, 46, 47

Colágeno 39, 41

Colecalciferol 39, 40, 41, 44

Composição genética 51

Contaminação 25, 62, 69, 70, 74, 75, 77, 79, 85

#### D

Desenvolvimento biopsicossocial 1, 2

Deteção 38, 62, 63, 67, 72, 76, 79, 82

Deterioração 24, 62, 63, 64, 78

Digestibilidade 83, 84, 87, 88, 89, 90, 92

#### E

Ensilagem 84, 85, 88, 91, 92

Equoterapia 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9

Estrógeno 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20

#### F

Fenótipo 51, 53

Formaldeído 23, 24, 25, 27, 38

## **G**

Glicerina loira 23, 24, 26, 29, 36, 37, 38

Grão úmido de milho 83, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92

Grupo genético 51, 53, 54, 55, 56, 59

## **I**

Interdisciplinar 1, 2, 81

## **M**

Melatonina 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21

Melhoramento animal 51

## **P**

Patógenos 61, 62, 67, 75

Peças anatômicas 23, 25, 37, 38

Pinelectomia 10, 12, 14, 15, 18

Postura 3, 9, 39, 41, 46, 47, 49

Proteína óssea 39

## **R**

Raça girolando 51

## **S**

Silagem 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93

Sobrevida 10, 11, 13

## **T**

Terapia 1, 2, 4, 5, 6, 11, 80

Tumor 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21

## **V**

Volatilização 24, 27, 28, 35, 36, 37, 38

